

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

المعهد القومي للعلوم الفلاحية  
الحراش-الجزائر  
INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE  
EL HARRACHE – ALGER

**THESE**

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTERE  
EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Option: **PHYTOPATHOLOGIE**

Thème:

**OPTIMISATION DES FACTEURS  
INFLUENCANT L'ISOLEMENT DE  
PROTOPLASTES DE POMME DE  
TERRE**

Présenté par:

**M<sup>lle</sup> KADRI NADIA**

**Président: M<sup>me</sup> MEKLI.CHE.L**

**Directeur de these: M<sup>r</sup> KHELIFI.L**

**Examineurs: M<sup>r</sup> KEDDAD.A  
M<sup>me</sup> KHELIFI.M  
M<sup>r</sup> MORSLI.S**

ANNEE UNIVERSITAIRE 2006 - 2007

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I- Données générales sur la pomme de terre.....	3
1-1 <i>Taxonomie</i> .....	3
1-2 <i>Description morphologique</i> .....	4
1-2-1 <i>Appareil aérien</i> .....	4
1-2-2 <i>Appareil souterrain</i> .....	4
1-3 <i>Physiologie de la pomme de terre</i> .....	4
1-3-1 <i>Physiologie du développement</i> .....	4
1-3-2 <i>Physiologie de la tubérisation</i> .....	5
1-3-2-1 <i>Facteurs endogènes</i> .....	5
1-3-2-2 <i>Facteurs exogènes</i> .....	5
II- <i>Maladies de la pomme de terre</i> .....	5
2-1 <i>Maladies fongiques</i> .....	5
2-2 <i>Maladies bactériennes</i> .....	6
2-3 <i>Maladies virales</i> .....	6
III- <i>Amélioration génétique par voie classique de la résistance aux maladies chez la pomme de terre</i> .....	9
3-1 <i>Source génétique de la résistance aux maladies</i> .....	9
3-2 <i>Création variétale</i> .....	10
1. <i>Diploïdisation des cultivars tétraploïdes</i> .....	10
2. <i>Sélection au niveau 2n</i> .....	10
3. <i>Retour au niveau tétraploïde</i> .....	10
3-3 <i>Difficulté et limite de la sélection classique</i> .....	10
IV- <i>Amélioration génétique par voie biotechnologique de la résistance aux maladies chez la pomme de terre</i> .....	11
4-1 <i>Variation somaclonale</i> .....	13
4-2 <i>Haplométhodes</i> .....	13
4-3 <i>Assainissement</i> .....	13
4-4 <i>Hybridation somatique</i> .....	14
V- <i>Protoplastes</i> .....	14
5-1 <i>Qu'est ce qu'un protoplaste ?</i> .....	15
5-2 <i>Comment obtient-on des protoplastes ?</i> .....	15
5-2-1 <i>Plasmolyse des tissus</i> .....	15
5-2-2 <i>Elimination de la paroi et libération des protoplastes</i> .....	16

5-2-2-1 Méthode mécanique.....	16
5-2-2-2 Méthode enzymatique.....	16
a/ Structure de la paroi.....	17
b/ Les enzymes.....	17
5-3 Sources de protoplastes.....	17
5-4 Cultures de protoplastes.....	18
5-4-1 Purification des protoplastes.....	18
5-4-2 Milieu de culture.....	18
5-4-3 Densité de culture.....	18
5-4-4 Suivi de la culture.....	
5-5 Intérêts des protoplastes dans l'amélioration de la pomme de terre.....	22
	<b>22</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>22</b>
<b>I- Objectif de l'expérimentation.....</b>	<b>22</b>
<b>II- Multiplication.....</b>	<b>22</b>
	22
2-1 Matériel végétal.....	24
2-2 Désinfection du matériel végétal.....	24
2-3 Milieu de culture.....	
2-4 Mise en culture.....	<b>24</b>
2-5 Conditions de culture.....	24
	24
<b>III- Callogénèse.....</b>	<b>25</b>
3-1 Matériel végétal.....	
3-2 Milieu de culture.....	
3-4 Mise en culture.....	<b>25</b>
	25
<b>IV- Isolement de protoplastes.....</b>	<b>25</b>
4-1 Matériel végétal.....	26
4-2 Milieu de macération.....	26
4-3 Traitements effectués.....	26
4-5 Purification.....	26
4-6 Méthode de comptage de protoplastes.....	26
4-7 Analyse statistique.....	<b>28</b>
4-8 Protocole expérimental.....	28
	28
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>28</b>
<b>I- Multiplication.....</b>	<b>30</b>
1-1 Effet des générations sur le taux de reprise des vitroplants.....	32
1-2 Effet des générations sur le diamètre des tiges des vitroplants.....	34
1-3 Effet des générations sur le nombre de feuilles des vitroplants.....	
1-4 les microtubercules.....	<b>35</b>
1-4 Bilan.....	35

<b>II- Callogénèse.....</b>	<b>35</b>
2-1 Réactivité des explants.....	36
2-2 Temps d'initiation de cals.....	38
2-3 Taux de callogénèse.....	38
2-4 Croissance des cals.....	
2-5 Bilan.....	<b>41</b>
	41
<b>III- Isolement de protoplastes.....</b>	<b>41</b>
3-1 protoplastes de mésophylle foliaire.....	42
3-1-1 Effet du mannitol.....	42
3-1-2 Effet de la cellulase.....	43
3-1-3 Effet de la pectinase.....	46
3-1-4 Effet de la vitesse d'agitation.....	46
3-2 Protoplastes de cals.....	46
3-1-1 Effet du mannitol.....	47
3-1-2 Effet de la cellulase.....	47
3-1-3 Effet de la pectinase.....	48
3-1-4 Effet de la vitesse d'agitation.....	<b>50</b>
3-3 Bilan.....	50
3-4 Effet de la température de macération.....	51
3-5 Effet de la fragmentation des feuilles.....	52
3-6 Effet de l'âge des feuilles.....	
3-7 Effet de la préplasmolyse.....	<b>53</b>
	53
<b>IV- Purification.....</b>	<b>56</b>
A/ Gradient à fortes densités.....	58
B/ Gradient à faibles densités.....	
C/ Purification sur gradient discontinu (deux couches).....	<b>60</b>
	60
<b>Discussion Générale.....</b>	<b>60</b>
1- Multiplication.....	61
2- Callogénèse.....	
3- Isolement de protoplastes.....	65
<b>VI- Conclusion Générale.....</b>	

**Références bibliographiques.**

Annexe

## **Liste des figures**

- Fig1 : Effet des générations sur l'évolution du taux de reprise des vitroplants.*
- Fig2 : Effet des générations sur l'évolution du diamètre des tiges des vitroplants.*
- Fig3 : Effet des générations sur l'évolution du nombre de feuilles des vitroplants.*
- Fig4 : Evolution du pourcentage de reprise des microtubercules en fonction du temps.*
- Fig5 : Variation du diamètre des vitroplants de microtubercules en fonction du temps.*
- Fig6 : Variation du nombre de feuilles par vitroplants de microtubercules en fonction du temps.*
- Fig7 : Effet de la balance hormonale et du type d'explants sur le temps d'initiation des cals.*
- Fig8 : Effet de la balance hormonale et du type d'explants sur le taux de callogenèse.*
- Fig9 : Effet de la balance hormonale et du type d'explants sur croissance des cals.*
- Fig10: Effet de la concentration du mannitol sur le rendement en protoplastes de mésophylle.*
- Fig11: Effet de la concentration de la cellulase sur le rendement en protoplastes de mésophylle.*
- Fig12: Effet de la concentration de la pectinase sur le rendement en protoplastes de mésophylle.*
- Fig13: Effet de la vitesse d'agitation sur le rendement en protoplastes de mésophylle.*
- Fig14: Effet de la concentration du mannitol sur le rendement en protoplastes de cals.*
- Fig15: Effet de la concentration de la cellulase sur le rendement en protoplastes de cals.*
- Fig16: Effet de la concentration de la pectinase sur le rendement en protoplastes de cals.*
- Fig17: Effet de la vitesse d'agitation sur le rendement en protoplastes de cals.*
- Fig18 : Evolution des rendements de protoplastes en fonction de la composition de la solution de macération, du temps et de l'origine de l'explant*
- Fig19: Evolution des rendements en protoplastes en fonction de la température de macération.*
- Fig20: Evolution des rendements en protoplastes en fonction de l'aspect des feuilles.*
- Fig21: Evolution des rendements de protoplastes en fonction de l'âge des feuilles.*
- Fig22: Effet de la préplasmolyse sur l'évolution des rendements de protoplastes.*
- Fig23: Effet des fortes densités de saccharose (monocouche) sur le degré de purification de protoplastes*
- Fig24: Effet des faibles densités de saccharose (monocouche) sur le degré de purification de protoplastes*
- Fig25: Effet du gradient discontinu à deux couches de saccharose sur le degré de purification de protoplastes.*

## **Liste des tableaux**

*Tableau1 : Principales maladies fongiques de la pomme de terre.*

*Tableau2 : Principales maladies bactériennes de la pomme de terre.*

*Tableau3 : Principaux virus de la pomme de terre.*

*Tableau4 : Composition chimique du milieu de culture de base et des solutions mères (multiplication, callogenèse, isolement de protoplastes).*

*Tableau5 : Balances hormonales utilisées pour la callogenèse.*

*Tableau6 : Concentration des différents constituants de la solution de macération.*

*Tableau7 : Protocole expérimental.*

## Liste des planches

Planche1 : Multiplication à partir des germes de tubercules.

Planche2: Vitroplant de la G1 (Grandes feuilles, composées, bien développées à nombre élevé, tige à diamètre important).

Planche3 : Micropropagation de vitroplants à partir de microtubercules.

Planche4 : Développement des vitroplants de la G1 après 5 semaines de culture.

Planche5 : Callogénèse sur entre nœuds en T3(2.4D/BAP=2).

Planche6 : Callogénèse sur entre nœuds en T2 (2.4D/BAP=1).

Planche7: Callogénèse en présence de fortes concentrations de BAP(2.4D/BAP=0.5).

Planche8 : Macération du tissu foliaire.

Planche9 : Différentes dimensions de Protoplastes libérés.

Planche10 : Protoplastes prépurifiés (sans gros débris).

Planche11 : Purification de protoplastes isolés.

## **Introduction**

La pomme de terre est l'une des cultures principales et de première nécessité dans l'agriculture mondiale. Sa production occupe le cinquième rang après le blé, le riz, le maïs et l'orge (Hooker, 1991). Elle peut être cultivée sous divers climats. Vu ses fortes potentialités de production, elle peut produire, lorsque les conditions sont favorables, en trois à cinq mois 40 à 50T/ha (Rousselle, 1992).

En Algérie, elle représente un produit de base dans les habitudes alimentaires de la population avec une demande de plus en plus importante. Elle occupe la première place dans le domaine des cultures maraîchère (MADR, 2000), avec des superficies réservées à sa culture représentant près de 40% des surfaces consacrées aux maraîchage (MADR, 1991). Le rendement national moyen enregistré en 2003 est de 18.3T/ha (FAO,2004). Il est considéré, cependant, comme relativement faible. Cette faiblesse est due essentiellement à la non maîtrise des itinéraires techniques et aux nombreuses maladies susceptibles d'attaquer la culture. En effet, parmi toutes les plantes cultivées, la pomme de terre est probablement celle qui connaît le plus d'ennemis dont certains parmi les plus redoutables (Rich, 1983).

Par conséquent, l'utilisation de variétés adaptées à notre climat et résistantes s'impose comme un moyen inévitable pour réduire les fluctuations de rendements.

Dans ce contexte, les programmes d'amélioration génétique de la pomme de terre visent essentiellement à pourvoir les cultivars résistants, et/ou de créer et sélectionner de nouveaux génotypes qui soient résistants ou tolérants aux principales maladies.

Les espèces sauvages présentent une grande diversité génétique d'où une source indéfinie de résistances aux stressés biotiques et abiotiques. Cependant, leur utilisation dans les programmes d'amélioration par les méthodes classiques est limitée par l'étroite base génétique des espèces tétraploïdes cultivées et des contraintes rencontrées lors des combinaisons aléatoires des caractères. Des problèmes s'élèvent aussi de la fréquente stérilité mâle, ainsi que la transmission et l'accumulation des virus. De plus, le niveau tétraploïde est associé à une forte hétérozygotie et provoque une très grande complexité de l'expression des caractères ce qui rend la sélection très longue et très lourde.

En raison de ces barrières rencontrées au croisement, l'utilisation des techniques de culture *in vitro* et de biotechnologie dans les nouveaux programmes de sélection, est devenue incontournable.

La pomme de terre s'avère une plante modèle pour l'application des différentes méthodes biotechnologiques dont la technique de protoplastes qui offre des perspectives prometteuses et ce pour différentes raisons :

- ✓ Possibilité d'induire une variation somaclonale importante lors du passage par les stades protoplastes ensuite cals pour la régénération de plants.
- ✓ Introgression de matériels génétiques par transfert d'ADN et/ou d'organites cellulaires entiers (mitochondries, chloroplastes).

- ✓ Hybridation somatique par fusion de protoplastes intra et interspécifique avec des espèces sauvages diploïdes sexuellement incompatibles.
- ✓ Possibilité d'élever le niveau de ploïdie par autofusion.

Toutes ces approches paraissent enthousiastes du fait que la variabilité génétique, inaccessible par les voies classiques, devient alors expérimentalement inductibles. Il existe, toutefois, un obstacle majeur à leur mise en œuvre, c'est la maîtrise de l'obtention et de la mise en culture de protoplastes viables pour la régénération de plants entiers.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes assignée l'objectif d'optimiser les conditions déterminantes pour l'isolement et la purification des protoplastes en vue de régénérer des plants, en utilisant, comme génotype, la variété « Désirée ».

## **I – Données générales sur la pomme de terre**

### **1-1 Taxonomie :**

La pomme de terre, «*Solanum tuberosum* L.», appartient à la famille des *Solanacées* qui compte des genres aussi variés que *Nicotinia*, *Lycopersicum*, *Petunia*, *Capsicum*, *Physalis*, ainsi que *Solanum*. Ce dernier regroupe environ 1000 espèces dont plus de 200 sont tubéreuses. L'ensemble de ces espèces forme un groupe ayant un nombre chromosomique de base  $X= 12$  allant du niveau diploïde au niveau hexaploïde. Cette classification tient compte des critères morphologiques classiques en particulier ceux des fleurs. Selon Rossignol (1996), Hawkes, taxinomiste récent, a déterminé des groupes en fonction de la forme de la corolle : de Stella, super-série présentant des fleurs à corolle en forme d'étoile jusqu'à Rotata à corolle ronde, avec plusieurs intermédiaires. Le passage d'un groupe à l'autre semble être un critère évolutif. A l'heure actuelle, les techniques de la biologie moléculaire permettent une classification plus précise en apportant de nouveaux éléments, basés sur l'analyse de l'ADN.

### **1-2 Description morphologique:**

La pomme de terre est une espèce herbacée, vivace par ses tubercules, cultivée comme une espèce annuelle. Tous ses caractères morphologiques sont très variables et sont une caractéristique variétale plus ou moins influencée par le milieu (Rousselle *et al.*, 1990).

#### **1-2-1- Appareil aérien :**

*Les tiges aériennes*, de couleur verte, sont au nombre de 2 à 10, parfois d'avantage (Soltner, 1999). Elles sont de port plus ou moins dressé, suivant les variétés, et de section irrégulière. Ces tiges renferment un glycoalcaloïde toxique : la solanine, qui peut également se former dans les tubercules lorsque ceux-ci sont longuement exposés à la lumière (Darpoux et Debelley, 1967).

*Les feuilles* sont composées, alternées et disposées sur la tige suivant une phyllotaxie spiralée (Rossignol, 1992), et dont la forme, la couleur et l'allure générale servent à la classification ((Darpoux et Debelley, 1967).

*Les inflorescences* sont des cymes axillaires toujours situées à l'extrémité d'une tige et portées par une hampe inflorescencielle improprement appelée pédoncule.

*La fleur* allogame, est gamopétale, gamosépale, actinomorphe et pentamère. Ses étamines, en nombre de 5, portent des anthères accolées formant un manchon, leur déhiscence est poricide, ce qui est une caractéristique particulière du genre *Solanum* (Rossignol, 1992).

Les fleurs sont souvent mâles stériles, chez environ 1/3 des variétés (Rousselle *et al.*, 1990), il s'agit d'avortement partiel ou total des étamines ou de stérilité du pollen (Rossignol, 1992).

*Le fruit* est une baie sphérique de couleur verte jaunissant à maturité, il peut contenir jusqu'à 200 graines (Rousselle *et al.*, 1990). La fructification de la pomme de terre est un phénomène rare, à l'exception de quelques variétés fructifères (Rossignol, 1992), telle que Kerpondy et Kaptah Vandel. On connaît aussi des variétés qui fleurissent abondamment mais qui ne fructifient pas (Grisson, 1983). De ce fait, la reproduction de la pomme de terre dans la pratique agricole ne se fait pas par graine,

par contre cette dernière (True seeds) est l'outil par excellence de la création variétale et de toutes autres études génétiques fondamentales.

**1-2-2 Appareil souterrain :** Le système souterrain représente la partie la plus intéressante de la plante puisqu'on y trouve les tubercules qui confèrent à la pomme de terre sa valeur alimentaire (Rousselle *et al.*, 1990).

Les racines adventives sont nombreuses et fasciculées, elles naissent au niveau des nœuds enterrés des tiges feuillées, au niveau des nœuds des stolons et directement sur les tubercules au niveau des yeux.

### **1-3 Physiologie de la pomme de terre**

#### **1-3-1 Physiologie du développement :**

En partant du tubercule récolté, le cycle végétatif de la pomme de terre comprend quatre étapes : repos végétatif, germination, croissance, tubérisation.

Les tubercules se trouvent dans un état de **repos végétatif**, phase pendant laquelle ils ne peuvent germer même dans des conditions optimales de température et d'humidité (Soltner, 1999). La durée de cette phase varie selon les variétés. Juste après, les tubercules entrent en germination lorsqu'ils sont placés dans des conditions favorables de 16 à 20°C et 80% HR (Elisseche, 1996), et c'est le bourgeon principal de l'œil situé au sommet de la couronne qui entre en premier en croissance active donnant naissance à un germe : C'est la phase de **germination**. Ces germes se transforment en tiges feuillées dont les bourgeons axillaires donnent, au dessus du sol des rameaux et dans le sol des stolons (Soltner et Madec, 1960). Après la levée, les tiges entrent en **croissance** et acquièrent progressivement leur autonomie vis-à-vis du tubercule mère. Au bout d'un certain temps de croissance, les extrémités des stolons cessent de croître et se renflent pour former les ébauches de tubercules fils. Cette phase se prolonge jusqu'à la mort de la plante : **la tubérisation**.

#### **1-3-2 Physiologie de la tubérisation:**

De nombreux facteurs endogènes et exogènes sont impliqués dans le bon déroulement du processus de tubérisation, depuis l'état physiologique du tubercule mère mis en culture, (Madec, 1980), jusqu'aux conditions environnementales comme la photopériode et la thermopériode.

##### **1-3-2-1 Facteurs endogènes:**

La tubérisation est sous la dépendance de substances chimiques agissant à doses très faibles et élaborées par la plante elle-même (Darpoux et Debelley, 1967).

Elles sont désignées sous le nom de substance de tubérisation. Ces substances sont élaborées par le feuillage et aussi par le tubercule pendant la période de conservation qui précède la plantation. Toutefois, cette élaboration est conditionnée par la température et la photopériode. L'état physiologique du tubercule mère influence l'induction de la tubérisation (Rousselle *et al.*, 1990).

##### **1-3-2-2 Facteurs exogènes :**

La tubérisation est influencée par les facteurs du milieu, principalement la photopériode et la température. Les jours courts ou plus précisément les nuits longues (Elisseche, 1996) favorisent l'induction de la tubérisation. Cependant l'influence de la photopériode sur la tubérisation est

relativisée en fonction du génotype, chacun ayant une longueur de jour critique au-dessus de laquelle il ne peut tubériser. La pomme de terre est donc une plante de jours courts pour sa tubérisation, et son adaptation à des latitudes plus élevées est assurée grâce à la sélection de génotypes dont la photopériode critique se situe parfois dans les jours longs (Elisseche, 1996). La température exerce, comme la photopériode, une influence directe sur la tubérisation et ce sont les températures basses qui lui sont les plus favorables.

## **II - Maladies de la pomme de terre:**

Selon Messiaen (1981), la multiplication végétative par tubercules favorise beaucoup plus la propagation des agents pathogènes que la multiplication par graines, et il n'est pas rare qu'un même tubercule héberge plusieurs agents pathogènes en même temps. Darpoux et Debelley, (1967) estime que, parmi toutes les plantes cultivées, la pomme de terre est probablement celle qui connaît le plus d'ennemis, dont certains sont parmi les plus redoutables. Elle est susceptible à un grand nombre de maladies qui peuvent être localisées ou dispersées à travers le monde. Rich, (1983) a énuméré 60 maladies de *Solanum tuberosum*.

### **2-1 Maladies fongiques:**

Le mildiou, désigné aussi sous le nom de choléra de la pomme de terre (Gault, 1936), est considéré comme l'une des plus anciennes, plus connues et plus graves maladies de la pomme de terre (Rich, 1983). Cette maladie est à l'origine de la mort d'au moins un million et demi de personnes en Irlande entre 1845 et 1851 (Hampton, 1992) à cause de la famine. Aujourd'hui encore, le mildiou reste le principal facteur limitant la culture de la pomme de terre à l'échelle mondiale (Duvauchelle et Andrivau, 1996). Il est causé par *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Les symptômes peuvent être observés à la fois sur feuilles, tiges et tubercules à tous les stades de développement de la plante. Les attaques précoces sont les plus dommageables (James *et al.*, 1972) et les attaques tardives se traduisent surtout par des taux de contamination élevés des tubercules d'où la perte totale de leur valeur marchande. En plus, d'autres maladies fongiques susceptibles de toucher la pomme de terre sont mentionnées dans le tableau 1.

### **2-2 Maladies bactériennes:**

Les bactéries qui attaquent les cultures de pomme de terre constituent un groupe important de pathogènes malgré leur nombre réduit (Rich, 1983) comparativement aux champignons et aux virus. Leur introduction dans la plante se fait principalement par les blessures, mais elles s'introduisent aussi à travers les ouvertures naturelles (stomates). Seules les 4 principales maladies bactériennes causées par *Erwinia* sp. *Pseudomonas* sp. *Streptomyces* sp. et *Clavibacter* sp. (Centre Interprofessionnel de la Pomme de terre, 1979 ; Centre Interprofessionnel de la Pomme de terre, 1996) seront mentionnées ( tableau 2).

### **2-3 Maladies virales:**

La plupart des maladies virales de la pomme de terre sont réparties mondialement dans tous les lieux de production de la pomme de terre (Sedouki, 1986). On en compte au moins 25 virus (Perennec, 1982). Les maladies à virus peuvent constituer pour la culture une menace permanente en raison de leur capacité d'envahir progressivement toutes les cellules et tous les organes de la plante à partir du point d'inoculation. Parmi ces virus, les plus importants sont donnés dans le tableau3.

**Tableau I : Principales maladies fongiques de la pomme de terre**

Nom de la maladie	Agent causal	Symptômes	Importance	Auteurs
<b>Rhizoctone brun</b>	<i>Thanatephorus cucumeris</i> Donk (= <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn)	✓ Présence de sclérotés sur les tubercules fils	✓ Perte de la valeur marchande des tubercules	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Darpoux, 1967</li> <li>• Messiaen, 1981</li> <li>• Bedin, 1996</li> </ul>
<b>Fusariose</b>	<i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> Fr.	✓ Surface du tubercule plissée en rides concentriques sur le point d'infection ✓ Destruction des tissus colonisés donnant des cavités internes.	✓ Plus grave maladie de conservation ✓ Largement distribuée dans le monde	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rich, 1983</li> <li>▪ Tivoli, 1996</li> </ul>
<b>Galle argentée</b>	<i>Helminthosporium solani</i> Dur. & Mont.	✓ Taches circulaires d'aspects argentés à contour irrégulier sur tubercules	✓ Maladie de conservation ✓ Perte de la valeur marchande des tubercules	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CIP, 1979</li> </ul>
<b>Galle verruqueuse</b>	<i>Synchytrium endobioticum</i> Perc.	✓ Excroissance irrégulière de grosseur variable et de couleur noire	✓ Les verrues finiront par pourrir rendant les tubercules inutilisables	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gault, 1936</li> <li>• Darpoux, 1967</li> <li>• Messiaen, 1981</li> </ul>

**Tableau II : Principales maladies bactériennes de la pomme de terre.**

Nom de la maladie	Agent causal	Symptômes	Importance	Auteurs
<b>Pourriture brune</b>	<i>Ralstonia solanacearum</i> Yabuuchi <i>et al.</i> 1996 (= <i>Pseudomonas solanacearum</i> Smith 1914).	✓ Flétrissement brutal du feuillage ✓ Taches marron sur tubercule qui donnent une pourriture complète	✓ Maladie vasculaire tellurique parmi les plus destructives	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Darpoux, 1967</li> <li>• Persley, 1986</li> <li>• Hayward, 1991</li> </ul>
<b>Jambe noire</b>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atrosapiticum</i> Hauben <i>et al.</i> 1999 (= <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> Dye 1969).	✓ Pourriture de la base des tiges ✓ Pourriture molle et gluante sur tubercules	✓ En cas d'attaque précoce la récolte peut être nulle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gault, 1936</li> <li>• Rich, 1983</li> </ul>
<b>Flétrissement bactérien "pourriture annulaire"</b>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> David <i>et al.</i> 1984 (= <i>Corynebacterium sepedonicum</i> Skaptason et Burkholder 1942).	✓ Flétrissement total du plant ✓ Pourriture en anneau sur le tubercule	✓ C'est la plus contagieuse et la plus redoutable des maladies bactériennes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CIP, 1979</li> <li>• Messiaen, 1981</li> <li>• Rich, 1983</li> </ul>
<b>Galle commune</b>	<i>Streptomyces scabiei</i> Lambert et Loria 1989. (= <i>Streptomyces scabies</i> Lambert et Loria).	✓ Chancre de taille variable en surface ou en profondeur ✓ Epaissement du périoderme	✓ Perte de la valeur marchande du tubercule	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gaucher <i>et al.</i>, 1997</li> </ul>

**Tableau III : Principaux virus de la pomme de terre**

Nom du virus	Symptômes	Transmission / Vecteurs	Importance	Auteurs
<b>Potato leaf-roll Virus 'PLRV'</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Enroulement des feuilles</li> <li>✓ Port dressé et nanisme de la plante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Plantes infectées</li> <li>✓ Plusieurs espèces de pucerons</li> </ul>	C'est le plus important des virus de la pomme de terre	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rich, 1983</li> <li>▪ CIP, 1979</li> </ul>
<b>Potato virus X 'PVX'</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mosaïque</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Essentiellement par puceron</li> </ul>	Très infectieux	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Madec et al, 1970</li> <li>▪ Kerlan, 1996</li> <li>▪ Darpoux, 1967</li> </ul>
<b>Potato virus Y 'PVY'</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Rabougrissement mosaïque</li> <li>✓ Déformation</li> <li>✓ Palissement</li> <li>✓ Tachetures nécrotiques</li> <li>✓ Striures des feuilles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Voie mécanique</li> <li>✓ Pucerons</li> </ul>	Formé de 3 groupes de souches : Y <sup>o</sup> , Y <sup>c</sup> , Y <sup>n</sup> , à différentes réaction sur les variétés de pomme de terre	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kerlan, 1996</li> <li>▪ Rousselle et Chauvin, 1995</li> </ul>
<b>Potato virus A 'PVA'</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Aspect frisé et ramassé du feuillage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Voie mécanique</li> <li>✓ Puceron (second vecteur)</li> </ul>	Moins important que le PVX et le PVY	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rich, 1983</li> <li>▪ CIP, 1979</li> </ul>

### **III – Amélioration génétique par voie classique de la résistance aux maladies**

#### **chez la pomme de terre:**

La pomme de terre se reproduit naturellement par multiplication végétative, ceci a pour avantage la possibilité de fixer un génotype intéressant quelle que soit sa structure génétique. Par conséquent, l'amélioration de la pomme de terre a connu un fort développement depuis le début du XIX siècle, elle concernait des caractères culturaux (précocité, productivité, adaptation...), ainsi que des caractères commerciaux (aspect du tubercule, qualité culinaire...). Ce n'est qu'après 1850, lorsque le mildiou a détruit toutes les cultures en Irlande, que le caractère "résistance aux maladies" a fait l'objet d'une attention particulière des améliorateurs.

#### **3-1 Source génétique de la résistance aux maladies:**

Ross (1986) a décrit brièvement la mise au point du matériel de sélection de base en utilisant des espèces sauvages pour l'introduction de gènes de résistance et de qualité dans les variétés de pomme de terre existantes. Les espèces *S. demissum* (6x), *S. acaule* (4x ;6x), *S. chacoense* (2x), *S. spgazzinii* (2x), *S. stoloniferum* (4x) et *S. vernei* (2x) ont été le matériel de base pour certaines variétés pour leur hypersensibilité et leur résistance au champ à *Phytophthora infestans*, au *Fusarium*, à la punaise du Colorado, à des pathotypes de gale verruqueuses, au virus X, Y, A. de la pomme de terre et au virus de l'enroulement des feuilles, aux nématodes des racines, pour leur résistance à la gelée, et pour leur faible teneur en sucre réducteurs et leur forte teneur en fécule. Des espèces telles que *S. berthaultii* (2x), *S. gourlayi* (2x ;4x), *S. bulbocastanum* (2x), *S. hertingii* (4x), *S. pinnatisectum* (2x), *S. sparsipilum* (2x), *S. etuberosum* (2x) et *S. brevidens* (2x) sont utilisées, depuis une dizaine d'année dans les programmes de sélection pour transférer dans la pomme de terre cultivée la résistance aux pucerons, à *Globodera pallida*, à *Pseudomonas solanacearum*, à *Synchytrium endobioticum*, à *Erwinia carotovora*, et la résistance à la meurtrissure (Jacobsen et Rousselle, 1993).

Mis à part les caractères désirés, les espèces sauvages contiennent un fort potentiel de variations génétiques additionnelles qui rendent possible la mise au point de géniteurs utilisés en sélection ou de variétés possédant une plus grande vigueur d'hybrides.

#### **3-2 Création variétale:**

Selon Rousselle *et al* (1992), le schéma de création variétale repose sur le principe suivant : croisement sexué suivi de l'élimination progressive de clones par accumulation de données. Cette méthode conduit à la création d'un grand nombre de variétés. Elle est cependant limitée par le type tétrasomique de la plupart des caractères et la complexité de leur génétique (Ortiz et Pelloquin, 1994), par l'hétérozygotie des parents et la stérilité du pollen (Pehu, 1996 ; Calleberg et Merker, 1997; Hansen *et al*, 1999 ). Le croisement interspécifique pour l'incorporation de gènes de résistance, faisant intervenir des espèces apparentées tétraploïdes, nécessite ainsi la réduction du niveau de ploïdie, jusqu'à 2n, afin d'augmenter et de mieux gérer la variabilité de départ.

Ceci a mené Pelloquin *et al* (1996) à proposer une nouvelle stratégie d'amélioration qui désigne à la fois l'introggression spécifique des caractères et l'élargissement de la base génétique, une stratégie

similaire à celle envisagée par Chase (1963) dans son schéma analytique de sélection basé sur trois étapes :

- Diploïdisation des cultivars tétraploïdes.
- Sélection au niveau  $2n$  après croisement.
- Retour au niveau tétraploïde.

### **1. Diploïdisation des cultivars tétraploïdes:**

Le développement d'embryon diploïde par parthénogenèse *in situ* est obtenu par pollinisation d'une plante tétraploïde par certains clones de *Solanum phureja* (Hougas, 1958 in Jacobsen et Rousselle, 1993). Les plantes obtenues sont des dihaploïdes puisqu'elles ont le nombre de chromosomes diploïde du groupe de l'espèce mais le nombre haploïde de l'espèce cultivée. Ces dihaploïdes constituent ainsi un matériel de base pour la sélection au niveau diploïde.

### **2. Sélection au niveau $2n$ :**

Les plantes dihaploïdes obtenues présentant une bonne fertilité sont croisées avec diverses espèces tubéreuses de *Solanum* diploïdes sauvages ou cultivées (Vilain, 1989) dans le but de combiner des caractères de résistances aux maladies et aux herbicides avec des caractères agronomiques acceptables (Hougas et Pelloquin, 1994). Vu la réduction du nombre de chromosomes de moitié ( $2x$  au lieu de  $4x$ ), les disjonctions apparaissent plus nettement dans la descendance, le nombre de combinaison est moins nombreux et le travail de sélection est, par conséquent, plus facile.

### **3. Retour au niveau tétraploïde:**

Les plants tétraploïdes présentent une plus grande vigueur par rapport aux diploïdes. Selon Vilain (1989), la taille des cellules est plus grande, le nombre de chloroplastes, de mitochondries et de nucléoles est accru, il en résulte un accroissement du potentiel de synthèse. Le retour aux niveaux tétraploïdes se fait donc systématiquement après l'obtention d'hybrides diploïdes intéressants. Ceci peut se faire de plusieurs façons.

- Traitement à la colchicine
- Utilisation de diplogamètes
- Autofusion somatique de protoplastes.

### **3-3 Difficultés et limites de la sélection classique:**

Les méthodes de création variétale, citées ci-dessus, ont donné beaucoup de résultats, elles présentent néanmoins de nombreuses contraintes :

- Étroitesse de la base génétique des espèces tétraploïdes cultivées due au faible nombre de clones introduits au départ à partir d'Amérique du sud, région d'origine (Rousselle *et al*, 1992 ; Pehu, 1996 ; Rousselle, 1996).
- Réduction de la fertilité voire même la stérilité totale du pollen d'un grand nombre de cultivars (Hansen, 1999).
- Passage obligatoire au niveau diploïde imposé par la complexité de l'hérédité tétrasomique des espèces cultivées.
- Autoincompatibilité.

- Nécessité d'un grand nombre d'hybrides (environ 100.000) pour avoir une chance d'obtenir une variété intéressante. Dix années sont nécessaires pour effectuer cette sélection puis dix autres années pour que la nouvelle variété soit homologuée, inscrite aux catalogues variétaux puis commercialisée à grande échelle (Ducreux *et al*, 1986).

Le schéma classique fait apparaître clairement que l'amélioration génétique de la pomme de terre est très lente, laborieuse, déficiente, exigeant un énorme encombrement en matériel végétal en raison de la grande variabilité de population, sans autant présenter de grandes garanties. Pour pallier cette difficulté, des efforts considérables ont été fournis pour le développement de la génétique des cellules somatiques aboutissant à l'émergence d'une nouvelle approche expérimentale celle de *la culture in vitro* et des biotechnologies qui constituent à la fois un outil fiable et de grande précision, permettant l'accélération des programmes d'amélioration, et un complément très appréciable pour les méthodes conventionnelles de l'amélioration de la pomme de terre.

## VI- Amélioration génétique par voie biotechnologique de la résistance aux maladies chez la pomme de terre:

Toute cellule végétale, quelle que soit sa spécialisation, du moment qu'elle est vivante et possède un noyau, est capable de reproduire la plante entière d'où elle provient : c'est la totipotence. C'est à cette remarquable capacité de la cellule végétale que la culture *in vitro* doit toute son extension et son essor. (Beauchesne, 1990).

Les cultures *in vitro*, à travers la pratique de plusieurs modalités d'approche, ont permis de transgresser tous les obstacles imposés par l'intégrité de l'espèce.

Selon Wenzel (1994), nombre de méthodes biotechnologiques et de *Culture in Vitro* développées sur des plantes modèles tel que le tabac et *Petunia* peuvent être transférées avec succès sur la pomme de terre et démontrent ainsi leur application sur des cultures de grande importance.

Nous citerons, ci-après, quelques techniques appliquées avec succès dans les programmes d'amélioration génétique de la pomme de terre.

### 4-1 Variation somaclonale:

Le processus de régénération de plants *in vitro* entraîne l'établissement d'une dédifférenciation des cellules de tissus ou d'organes cultivés sous des conditions de culture bien définies. En d'autres termes, la période de prolifération des cellules indifférenciées (cals) est imposée entre l'explant et le plant régénéré (Kumar, 1994). Ces régénérants ne sont pas toujours conformes à la plante d'origine, ils représentent des variations morphogénétiques et physiologiques très significatives (Fuller et Gallon, 1999) rassemblées sous le vocable de "*variation somaclonale*" (Heller, 2000). Elles peuvent porter sur la forme, la vigueur, la fertilité et affecter toute la plante ou certains de ses organes. Elles sont souvent liées à une mutation de l'ADN nucléaire ou cytoplasmique tel que les réarrangements chromosomiques par translocations, inversions, délétions (Téoulé, 1999), et à des

réactivations d'éléments transposables (Kumar,1994 ;Téoulé,1999). Il peut s'agir aussi de polypléidie et plus rarement d'aneuploïdie (Heller, 2000). La plupart de ces anomalies chromosomiques ont été observées chez des plants de pomme de terre régénérés à partir de cals.

La variation somaclonale, largement mise à profit pour la sélection de la pomme de terre, a laissé pourvoir de manière inattendue une source très riche de variation génétique aboutissant, selon Chagvardieff (1985), à l'élargissement de la gamme des espèces et cultivars travaillés. En effet, la culture de protoplastes de pomme de terre a permis à Shepard (1982) d'obtenir à partir de cultivar "Russ et Burbank" des variants à résistance améliorée vis-à-vis de *Phytophthora infestans* et d'*Alternaria solani*. A partir des cultivars "Maris piper" , " Foxton" et "Fetwell", des variants à résistance améliorée vis-à-vis de *Streptomyces scabies*, du virus Y ( PYV) et du virus de l'enroulement ( PLRV) ont été obtenus.

Si la valeur de la variation somaclonale réside dans le fait que les variants montrent occasionnellement une résistance aux maladies ou des caractères agronomiquement intéressants (Fuller et Gallon, 1999), elle pourrait aussi être un inconvénient lorsque la multiplication conforme est l'objectif de l'expérience, et son principal défaut réside dans le caractère imprévisible des modifications génétiques obtenues (Seilleur, 1989) ainsi que leur instabilité chez les descendants (Téoulé, 1999).

#### **4-2 Haplométhodes:**

La réussite, vers 1965, de la mise en culture d'anthères puis de grains de pollen immatures suivie de celle de la différenciation d'embryon conduisant à des plants haploïdes, est à l'origine d'une approche appelée "haplodiploïdisation" (Letouze et Beauchesne, 1990 ; Heller, 2000). Le principe des haplométhodes consiste à cultiver *in vitro* des gamétophytes (grains de pollen ou ovules) et à régénérer ensuite des plantes ayant un stock chromosomique contenant l'information génétique des gamétophytes. Cette technique a été d'une très grande importance pratique dans les programmes d'amélioration et de création variétale de la pomme de terre. En effet, lors de la réduction du niveau de ploïdie des cultivars tétraploïdes, l'application des haplométhodes amène un important gain de temps par rapport aux méthodes classiques de croisement chez *Solanum tuberosum* avec *Solanum phureja* qui nécessite une étape supplémentaire consistant, selon Téoulé (1999), à sélectionner les plantes haploïdes parthénogénétiques de *S. tuberosum*.

Outre le temps gagné, les haplométhodes présentent toute une série d'avantages :

- Variabilité exprimée plus importante, donc une sélection qui peut être plus efficace et plus précise.
- Etude génétique plus simple des modes de transmission des caractères (Hougas et Pelloquins, 1994).
- Croisements interspécifique facilités, car la plupart des espèces sauvages du genre *Solanum* sont diploïdes (Augé et Baccon-Gibot, 1990).
- Transfert direct de gènes des espèces de *Solanum* à 2n sauvages ou cultivées (Hougas et Pelloquin, 1994).

#### 4-3 Assainissement:

Les espèces à multiplication végétative en général et la pomme de terre en particulier favorisent l'extension des viroses pour lesquelles on ne dispose pas encore, à ce jour, de traitement curatif efficace. En effet, la pomme de terre est sujette à un grand nombre d'attaques virales. On en compte, selon Perennec (1982), au moins 25 virus pouvant présenter une vraie menace de disparition de certaines variétés.

D'autre part, chez une plante virosée, la répartition du virus semble très variable selon l'organe (Margara, 1982). Le méristème qui représente des petits massifs de cellules indifférenciées à division intense situées au cœur des bourgeons et aux extrémités des racines, est le seul territoire quasiment indemne même lorsque toute la plante est infectée. C'est en se basant sur ce principe que Morel et Martin (1952) ont démontré qu'il était possible d'obtenir des clones sains à partir de plantes virosées par culture *in vitro* de méristèmes (Zrýd, 1988 ; Téoulé, 1999).

La réussite de cette méthode a été établie par le sauvetage d'un cultivar de pomme de terre (Belle de Fontenay) sujet à une infection virale chronique et qui était sur le point d'être abandonné. Selon Heller (2000), les tubercules de ce cultivar commercialisés actuellement proviennent encore des plantes saines régénérées à partir de méristèmes en 1954.

Du point de vue expérimental, la taille optimum du méristème doit être testée en premier : les plus grandes sont plus faciles à manipuler, mais présentent une plus grande probabilité de transfert de virus. Dans une étude comparative avec plusieurs virus, il a été montré que, pour la guérison des souche contre le PVX, la taille du méristème à prélever est très critique, tandis que pour l'élimination du PVS, même 2mm de méristème peut, non seulement donner des régénérants indemnes de virus mais aussi ne produit jamais de cals (Wenzel, 1994).

#### 4-4 Hybridation somatique:

L'hybridation somatique est considérée comme une source importante de variation génétique du fait qu'elle permet de recombinaison d'une façon indépendante les trois informations portées par les cellules végétales : nucléaire, chloroplastique et mitochondriale. Elle conduit aussi à l'obtention d'hybrides interspécifiques qu'il n'est pas possible d'obtenir par voie sexuée.

De telles techniques présentent, cependant, un obstacle majeur en raison de la barrière naturelle que possède la cellule végétale : la paroi pectocellulosique. En effet, cette paroi, rigide et imperméable, joue le rôle de filtre sélectif qui protège la cellule contre le milieu extérieur rendant ainsi impossible toute manipulation. L'hybridation somatique n'est donc réalisable qu'après élimination de la paroi cellulaire aboutissant à la formation d'une structure particulière dite **protoplaste**.

## V - Les protoplastes

### 5-1 Qu'est ce qu'un protoplaste ?

Il est important de considérer, en premier lieu, l'usage général du terme "protoplaste". Plusieurs définitions ont été établies par les cytologistes et, selon Cocking (1972), c'est Heinstain en 1880 qui

fut le premier à utiliser ce terme (protos = premier, plastos = formé), il l'a défini comme l'ensemble du matériel situé à l'intérieure de la paroi pectocellulosique susceptible d'être plasmolysé (Gautheret et al, 1970). Par contre, d'autres auteurs (Zrýd, 1988 ; Augé et Baccon-Gibot, 1990 ; Razdan,1993; Dodds, 1995 ) considèrent que le protoplaste est le résultat de la suppression de la paroi cellulaire, il est définit alors comme « une cellule végétale *nue* débarrassée totalement de sa paroi pectocellulosique ». Cocking (1972) estime que cette définition n'est pas tout à fait juste du fait que le protoplaste représente la totalité des constituants de la cellule entièrement indépendante de la présence ou non de la paroi pectocellulosique.

L'isolement de protoplastes est une découverte effectuée sur les levures qui devait déclencher par la suite les recherches dans ce domaine sur les cellules végétales. En 1960, on avait obtenu de grandes quantités de protoplastes de levures en faisant agir en milieu hypertonique le suc digestif d'escargot (Chupeau et Bourgin 1980). La première obtention de protoplastes de cellules végétales date de 1960 et réalisée par une équipe Anglaise, mais elle resta pratiquement la seule à s'y intéresser (Cocking, 1972). Ce n'est qu'en 1968 qu'une équipe Japonaise, Takebe *et al* (1972) perfectionna cette technique pour la rendre opérationnelle (Letouze et Beauchesne, 1999). Ils démontrèrent alors que le fait de priver momentanément la cellule végétale de sa paroi n'altère aucune de ses capacités puisqu'il était possible de régénérer des plantes à partir de protoplastes (Chupeau et Bourgin, 1980). C'est aussi au cours de cette phase que le protoplaste représente un matériel intéressant pour toute manipulation génétique.

## **5-2 Comment obtient-on des protoplastes ?**

La cellule végétale est normalement turgescence, le potentiel osmotique est équilibré par la pression exercée par la paroi cellulaire (Zrýd, 1988). C'est ce qui confère aux tissus végétaux leur rigidité. Si l'on envisage de supprimer cette paroi, il faudra préserver la structure intacte de la cellule et éviter son éclatement en établissant dans le milieu extérieur un potentiel osmotique suffisamment négatif aux protoplastes pour maintenir son intégrité.

La technique comporte 2 étapes :

- Plasmolyse des tissus et digestion enzymatique des parois.
- Elimination de la paroi et libération du protoplastes.

### **5-2-1 Plasmolyse des tissus:**

Elle a pour effet la rétraction de la vacuole suivie du décollement du plasmalemma des parois pectocellulosiques. La plasmolyse doit être complète, afin d'éviter que les structures de la membrane plasmique normalement étroitement liées à la paroi ne risquent d'être abîmées au cours de l'hydrolyse de la paroi (Gautheret et al, 1970). On cherche donc un abaissement de turgescence par des solutions hypertoniques les plus neutres (Demarly et Sibi, 1996), c'est-à-dire qu'elles ne doivent être ni toxiques ni métabolisables pour ne pas perturber le fonctionnement cellulaire (Téoulé, 1999). Les agents les plus couramment utilisés sont les oses alcool : mannitol, sorbitol, qui répondent assez bien à ces exigences (Zrýd, 1988 ; Chupeau et Bourgin, 1980). Scriban (1999) estime que le sorbitol,

présentant les avantages d'être plus soluble et moins onéreux, est parfois métabolisé par les cellules et les protoplastes.

Il est possible aussi d'utiliser des solutions salines à base de chlorure de calcium  $\text{CaCl}_2$  ou de chlorure de potassium KCl. Selon Scriban (1999) le traitement avec ce type de solution doit être de durée très brève car certains sels ont une action toxique en pénétrant dans la cellule.

La plasmolyse provoque non seulement la rétraction du contenu vacuolaire, mais aussi la déshydratation du cytoplasme et des organites (Chupeau et Bourgin, 1980), ainsi qu'un ensemble de modifications du comportement ultérieur du protoplaste et conditionne le succès des opérations suivantes (Scriban, 1999). Il est donc important d'accorder une attention particulière à cette étape par :

- Le choix de la concentration en agent plasmolysant qui doit tenir compte de la valeur initiale de la pression osmotique des cellules traitées.
- La durée de la phase de plasmolyse qui dépend de la viscosité des structures et du degré de vacuolisation des cellules.

#### **5-2-2 Elimination de la paroi et libération des protoplastes:**

Lorsque la plasmolyse est complète, les protoplastes prennent la forme arrondie à l'intérieur du cadre pectocellulosique, leur libération s'en suit alors par élimination de la paroi. Deux méthodes sont envisageables :

##### **5-2-2-1 Méthode mécanique:**

Elle est basée sur l'ouverture des parois cellulaires par section des tissus plasmolysés (Razdan, 1993 ; Dodds, 1995), les protoplastes sont alors libérés dans le milieu.

C'est la méthode utilisée en premier par Klercker en 1892 (Cocking, 1970 ; Razdan, 1993), elle a été adoptée par plusieurs chercheurs pour tous les travaux réalisés jusqu'à 1960 (Dodds, 1995). Cette méthode s'est révélée délicate et aléatoire et fut abandonnée pour les inconvénients qu'elle présente :

- Nécessité d'utiliser des cellules allongées afin que l'espace de rétraction soit important aux extrémités cellulaires, les tissus méristématiques peu vacuolisés et plus réactifs ne se prêtent généralement pas à cette technique (Augé et Baccon-Gibot, 1990).

Le choix du matériel végétal est, de ce fait, limité et l'inconvénient majeur réside dans le nombre réduit de protoplastes viables ainsi obtenus (Cocking, 1972 ; Razdan, 1993 ; Dodds, 1995).

Il existe toutefois un avantage de grande importance, c'est l'obtention de protoplaste dépourvus de reliques pariétales et de tous débris cellulaires, leur purification est alors simplifiée.

##### **5-2-2-2 Méthode enzymatique:**

Si l'on envisage d'utiliser des enzymes hydrolysant certaines liaisons de macromolécules de la paroi aboutissant à sa suppression, il faudra répondre à deux questions qui s'imposent :

- Quelle est la structure de cette paroi ?
- Quelles sont les enzymes qui permettent son hydrolyse ?

##### **A/ Structure de la paroi:**

La paroi n'est pas une structure inerte et fixe, sa composition chimique, très complexe, change pendant la différenciation cellulaire (Zrýd, 1988). Pour simplifier nous n'allons nous intéresser qu'au type de paroi qu'on trouve chez les tissus jeunes (pas très spécialisés) et qui est formée de 2 parties :

✓ *Lamelle moyenne* représente la cloison qui sépare les cellules et qui les cimente. Elle prend naissance, après la division cellulaire, suite au fusionnement des vésicules Golgiennes riches en composés pectiques.

✓ *Paroi primaire*, la cellulose est son constituant majeur (20 à 30% de la matière sèche de la paroi) mais elle renferme aussi des hémicelluloses, des composés pectiques et des protéines qui forment une sorte de matrice glycoprotéique au sein de laquelle se distribuent les molécules de cellulose (Heller, 2000).

### **B/ Enzymes de dégradation:**

Les organismes capables de dégrader les polysides sont assez peu nombreux, il s'agit essentiellement d'escargot, de bactéries et de champignons commensaux, saprophytes ou parasites (Chupeau et Bourgin 1980). Pour obtenir des activités enzymatiques et principalement pectinasiques et cellulasiques, on fait appel à des champignons tel que *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma viride* et *Aspergillus niger* (Zrýd, 1988). Ces activités enzymatiques sont, pour ces espèces, inductibles et extracellulaires, ce qui facilite leur préparation (Chupeau et Bourgin, 1980). On peut alors se procurer ce type d'enzymes dans le commerce :

- Les cellulases provoquent la digestion du matériel pariétal cellulosique
- Les pectinases provoquent la libération des cellules en digérant les composés pectiques de la lamelle moyenne.

Le traitement enzymatique consiste à faire macérer le tissu végétal dans une solution contenant les enzymes et les éléments nutritifs dont la pression osmotique est ajustée.

Takebe *et al* ont proposé en 1968, une approche dite séquentielle (Razdan, 1993 ; Dodds,1995) : C'est le traitement des tissus par de la pectinase en solution nutritive, l'enzyme dégrade la lamelle moyenne, les cellules se désagrègent et on obtient ainsi une solution de cellules isolées à laquelle on ajoute de la cellulase pour la dégradation des parois cellulosiques en présence du protecteur osmotique. Scriban (1999), estime que cette méthode est plus rigoureuse car elle permet d'obtenir des protoplastes bien séparés et toujours uninuclés.

Cooking (1968) a proposé la méthode simultanée qui consiste à mélanger les 2 enzymes en présence de l'osmoticum et l'isolement de protoplastes se fait en une seule étape. Selon Razdan (1993), plusieurs auteurs préconisent cette méthode car elle permet une économie du temps et une réduction des risques de contaminations microbiennes par élimination de certaines étapes.

L'isolement de protoplastes par la méthode enzymatique qu'elle soit séquentielle ou simultanée présente les avantages suivants :

- ✓ Elle est applicable sur pratiquement tous les types de tissus à condition que leurs cellules n'aient pas subi de lignification.
- ✓ Aucune cellule n'est détruite suite à l'élimination des parois (Rusunk, 1970).
- ✓ Elle permet d'obtenir un rendement considérable en protoplastes.

Par ailleurs, et comme les préparations enzymatiques industrielles ne sont pas pures, elles contiennent certains éléments toxiques pour les cellules végétales, telles que les ribonucléases et les peroxydases. Une longue durée de contact des tissus avec le mélange enzymatique conduit, selon Gautheret (1970) à une diminution du nombre de protoplastes viables ainsi qu'à une réduction de leur temps de survie.

Le choix de la concentration en enzymes, de la température et de la durée de l'incubation, du pH de la solution de macération dépend de l'espèce travaillée et de l'explant utilisé.

### ***5-3 Source de protoplastes:***

Bien que l'on puisse théoriquement préparer des protoplastes à partir de n'importe quel tissu végétal (Chupeau et Bourgin, 1980), le mésophylle foliaire reste la source de protoplaste la plus utilisée (Demarly, 1984 ; Augé et Baccon-Gibot, 1990 ; Demarly et Sibi, 1996) et la plus adéquate (Razdan, 1993). En effet, les feuilles présentent une grande surface de limbe formée par très peu d'assises cellulaires ce qui facilite le contact des enzymes de façon homogène avec un grand nombre de cellules.

Il est important aussi de mentionner que les conditions de culture des plantes donneuses de tissus source de protoplastes sont prépondérantes (arrosage, temps de culture, longueur du jour), en particulier si l'on envisage de régénérer des plantes à partir de protoplastes.

### ***5-4 Culture de protoplastes:***

#### ***5-4-1 Purification de protoplastes:***

Les protoplastes isolés ne peuvent être utilisés que lorsqu'ils sont purifiés, c'est-à-dire débarrassés et du milieu d'incubation (enzymes) et des débris végétaux libérés après macération (nervures, épiderme, fragments non digérés, cellules éclatées). Cette purification est réalisée par une succession de centrifugations dont la vitesse varie en fonction de l'espèce et du type du tissu.

#### ***5-4-2 Milieu de culture:***

On cultive les protoplastes sur des milieux du même type que ceux utilisés pour des cultures cellulaires (Demarly, 1984), en association avec un agent osmotique en concentration appropriée (Chupeau et Bourgin, 1980). Les milieux doivent aussi être assez riches en régulateurs de croissance et en sucre du fait que les protoplastes amorcent très rapidement une synthèse de paroi avant d'entrer en division (Demarly, 1984).

#### ***5-4-3 Densité de culture:***

La densité de culture est très critique puisqu'elle conditionne la régénération de parois puis l'entrée en division cellulaire. En effet, il est difficile d'obtenir un taux de division correcte à des densités trop faibles c'est-à-dire inférieur à 10 000 prot/ml (Téoulé, 1999) à cause d'un effet toxique de certains composants du milieu. D'autre part, les densités relativement fortes au départ introduisent une forte compétition trophique entre les colonies qui ne peuvent toutes se développer (Zrýd, 1988). De façon générale une densité de 30 000 à 80 000 prot /ml de milieu donne un taux de division correct (Demarly, 1984)

#### **5-4-4 Suivi de la culture:**

Les modes de culture sont nombreux : films liquides, films liquides sur milieu solide, microgouttes posées ou suspendues... Le plus souvent c'est le film liquide qui est utilisé. Parfois l'inclusion en gel d'agarose donne également de bons résultats (Téoulé, 1999). Dodds (1995) estime que l'utilisation de milieu solide est la meilleure méthode du fait qu'elle assure un support pour les protoplastes et facilite l'observation de leur développement.

Dès que les protoplastes sont placés dans le milieu de culture, ils commencent à régénérer une nouvelle paroi. Plusieurs auteurs estiment que la formation de la paroi est pratiquement immédiate dès que les cellules ne sont plus en présence d'enzymes. Selon Chupeau et Bourgin (1980), il semble que la synthèse de cellulose soit un processus continu.

Une fois la paroi reformée, les protoplastes entrent en division entre le troisième et le cinquième jour, formant des colonies, puis des microcals, puis des cals. L'apport régulier de milieu frais est assuré au cours de la culture tout en réduisant progressivement la concentration de l'agent osmotique. Au bout d'un mois les colonies sont visibles à l'œil nu.

#### **5-5- Intérêt des protoplastes dans l'amélioration de la pomme de terre:**

Il peut paraître tout à fait théorique de vouloir dénuder des cellules de plantes puis les remettre dans des conditions qui leur permettent leurs rhabillages. La technique de protoplastes (l'idée directrice étant l'élargissement de la variabilité génétique) fournit une excellente opportunité de recherches, aussi bien fondamentales qu'appliquées, dans l'amélioration génétique de la pomme de terre :

✓ Les protoplastes régénèrent rapidement une nouvelle paroi pectocellulosique. Ce processus offre un nouveau système d'étude de la biosynthèse de la paroi (Demarly, 1984 ; Dodds, 1995) et permet une meilleure connaissance de son rôle pour l'analyse des relations entre cytoplasme, plasmalemma et paroi (Demarly, 1984).

✓ Les protoplastes isolés peuvent subir un traitement mutagène puis mis en contact avec diverses substances toxiques, les colonies cellulaires étant isolées, le tri des mutants est facilité (Augé et Boccon-Gibod, 1990). Cette technique a ouvert une belle voie pour la recherche de variétés résistantes à diverses maladies.

✓ Les protoplastes débarrassés de la barrière naturelle, qui est la paroi, offrent la possibilité de leur faire absorber divers éléments tel que les acides nucléiques et des organites cellulaires comme les mitochondries ou les chloroplastes modifiant l'environnement cytoplasmique et nucléaire, conduisant ainsi à des formes génétiques nouvelles.

✓ La culture de protoplastes passe obligatoirement par le stade cal, le produit obtenu peut présenter des variations phénotypiques capables de se maintenir chez les descendants végétatifs ou même génératifs des régénérants (Semall, 1967). Le premier résultat d'intérêt agronomique dans ce sens a été obtenu chez la variété " Russet Burbank", chez laquelle plusieurs clones ont présenté une résistance marquée à *Alternaria solani* (Semall, 1967 ; Seilleur, 1989) ainsi qu'un taux de résistance au mildiou significativement supérieur, jusqu'à 92%. (Semall, 1967).

Mais l'intérêt majeur de cette technique réside dans l'aptitude qu'ont les protoplastes, une fois débarrassés de leur parois, à fusionner et donc, selon Seilleur (1989), à permettre la combinaison de 2 génotypes en un système amphidiploïde associant divers caractères indépendamment de leurs déterminisme génétique.

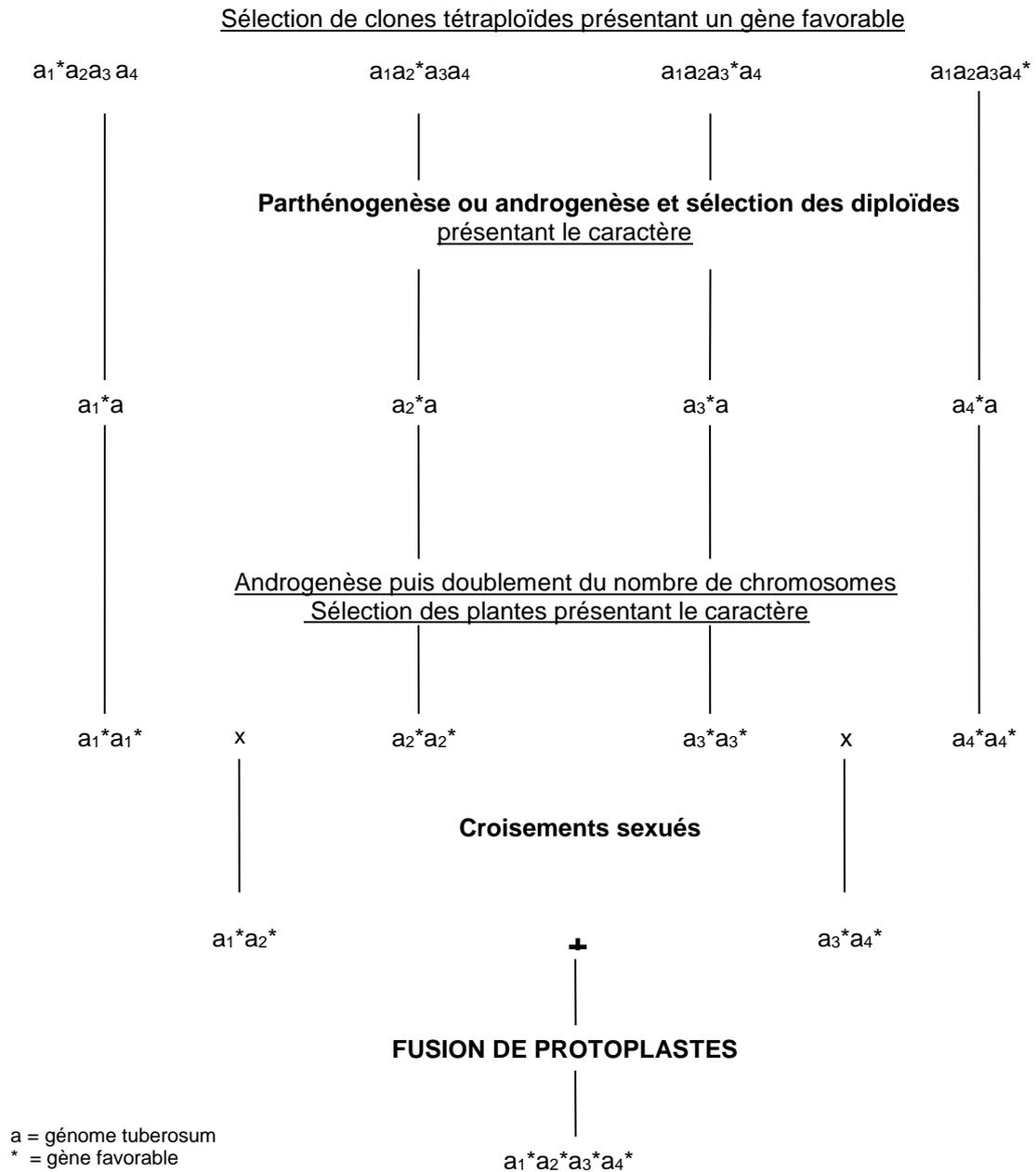
Dans le cas de la pomme de terre, les premiers hybrides somatiques sont obtenus par Melchers *et al.* (1978) avec la tomate : Les célèbres pomates n'ont pas eu d'avenir en raison de leur fortes anormalité (Rossignol, 1996).

En dépit de cet échec, cette technique a été de grande utilité dans les programmes de sélection et de création variétale de la pomme de terre en particulier dans la perspective d'amélioration pour la résistance vis-à-vis d'agents pathogènes. La stratégie consiste à introduire des résistances connues et identifiées chez des espèces sauvages appartenant au complexe de l'espèce cultivée mais ne se croisant pas facilement avec celle-ci (Téoulé, 1999). En effet, des résistances à des pathogènes viraux (PLRV, PVY, PVX) et autres (*Erwinia sp.*, *Phytophthora infestans* et *Globodera pallida*) présentes chez des espèces sauvages de *Solanum* ont été introduites par fusion somatique (Téoulé, 1999). Par ailleurs, Austin *et al.* (1985) et Gibson *et al.* (1988) ont combiné la résistance au virus de l'enroulement avec la résistance au mildiou en effectuant la fusion de protoplastes de *Solanum brevidens* et *Solanum tuberosum* (Karp *et al.*, 1988 ; Wenzel, 1994). De même, Helgeson *et al.* (1980) ont transféré à la pomme de terre la résistance au virus de l'enroulement apportée par *Solanum brevidens* (Demarly, 1996), ainsi que la résistance à *Erwinia sp.* par fusion de protoplastes (Pelletier, 1989 ; Wenzel, 1994). Guri et Sink (1988) ont transféré aussi la résistance au *Verticillium wilt* de *Solanum melongena* à *Solanum tuberosum* par fusion de protoplastes (Razdan, 1993). D'autre part, des hybridations somatiques avec *S. brevidens*, *S. phureja* et *S. pennellii* ont donné, en plus de la résistance au PVY et *Erwinia sp.* un niveau de fertilité plus important et d'autre caractères agronomiquement intéressants (Razdan, 1993).

Les travaux de l'équipe de Helgeson ont montré qu'il était possible de transférer à un clone cultivé tétraploïde des caractères génétiques d'une espèce sauvage non tuberifère diploïde *Solanum brevidens* par fusion somatique. Des hybrides somatiques 6x ont pu être régénérés. Ces hybrides possèdent la résistance au virus de l'enroulement apportée par *Solanum brevidens* et une résistance au mildiou apportée par le clone tétraploïde. Par contre aucun de ces hybrides n'a formé de tubercules. Une série de croisements successifs des hybrides somatiques avec le parent tétraploïde a permis de retrouver le niveau tétraploïde normal de la pomme de terre. Au cours de ces croisements, les descendants ont été sélectionnés pour le maintien des 2 résistances. La tubérisation est redevenue normale. Les tubercules de ces plants hybrides ont montré une résistance à *Erwinia sp.* (pathogène entraînant la pourriture du tubercule). Ce caractère provenant de *Solanum brevidens* puisque non tuberifère n'avait jamais pu être détecté auparavant.

Wenzel *et al.* (1979) ont proposé un schéma (fig1) associant plusieurs étapes de *culture in vitro* et de sélection à différents niveaux de ploïdie (Wenzel, 1994 ; Rousselle, 1999), le but était de constituer une structure tétraploïde totalement hétérozygote combinant les gènes favorables des 4

génotypes de départ (Rousselle, 1999), le génotype ainsi créé devrait pouvoir être directement une variété.



**Planche1:** Intégration de différentes techniques de changement de niveau de ploïdie dans les programmes d'amélioration génétique de la pomme de terre (Wenzel *et al*, 1979).

# Matériels et méthodes

## I- OBJECTIF DE L'EXPERIMENTATION

L'objectif visé par ce travail est d'optimiser les conditions d'obtention, de purification et de culture de protoplastes de pomme de terre. Pour cela, 3 étapes ont été abordées :

- Multiplication de plants de pomme de terre par la méthode classique de la micropropagation afin de disposer en permanence de quantités suffisantes de matériel végétal, destiné à l'obtention de protoplastes, tout au long de l'expérimentation.
- Callogénèse : il s'agit d'induire la formation de cals à partir de différents explants par l'emploi de régulateurs de croissance.
- Préparation de protoplastes et optimisation des conditions de leur isolement à partir de feuilles et de cals de vitroplants, en vue de leur culture.

## II- MULTIPLICATION.

Un mois après la germination, les germes de tubercules sont prélevés et coupés en autant de fragments que de nœuds pour les mettre en culture. Cette opération a été effectuée plusieurs fois tout au long de l'expérimentation.

### 2-1 Matériel végétal.

Nous avons choisi la variété "Désirée" comme matériel végétal, en fonction des résultats obtenus suite aux nombreux travaux réalisés à l'INA. En effet, cette variété est libre d'une part, et d'autre part elle possède de grandes aptitudes à la culture *in vitro* et présente en général de bons résultats.

Le matériel de base est constitué de 2 lots de pomme de terre :

1. Des microtubercules cultivés *in vitro* au laboratoire d'amélioration génétique de l'INA et conservés à la température ambiante pendant 8 mois.
2. Des tubercules fournis par le CNCC d'EL Harrach, et mis en germination à l'incubateur à 25°C.

### 2-2 Désinfection du matériel végétal.

Les fragments de germes sont placés dans de l'éthanol à 70° pendant 1mn, puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 12° pendant 10mn. Une fois stérilisés, les germes sont rincés 3 fois à l'eau distillée stérile, puis séchés sur du papier filtre stérile.

### 2-3 Milieu de culture.

Le milieu utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962) avec les vitamines de Morel. Nous avons préparé des solutions mères de macro éléments, de micros éléments, de fer et de vitamines séparément selon le tableau 4, et nous les avons conservées au froid (4°C), à l'abri de la lumière.

Tableau4 : Composition chimique du milieu de culture de base et des solutions mères (multiplication, callogénèse, isolement de protoplastes).

<b>Eléments</b>	<b>Concentration en mg/l Milieu MS (1962)</b>	<b>Concentration des solutions mère en mg/l</b>	<b>Quantités prélevées de la solution mère en ml pour 1L de milieu définitif</b>
<b>Macroéléments</b>			
KNO <sub>3</sub>	1900	38000	50
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	33000	
CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	440	8800	
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	370	7400	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	3400	
<b>Microéléments</b>			
MnSO <sub>4</sub> ,4H <sub>2</sub> O	22.3	2230	10
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	8.6	860	
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	6.1	610	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0.25	25	
KI	0.83	83	
CoCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0.025	2.5	
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0.025	2.5	
<b>FER</b>			
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	27.85	2785	10
EDTA	37.25	3725	
<b>Vitamines de MOREL</b>			
Thiamine HCl	0.1	10	10
Pyridoxine	0.5	50	
Acide nicotinique	0.5	50	
Myo-inositol	100		
<b>Source de carbone</b>			
Saccharose	30 000		
Agar	7 000		

Nous prélevons ensuite la quantité voulue de chaque solution mère dans une fiole dans laquelle nous rajoutons 100mg de myo-inositol, 30g de saccharose, 7g de gélose puis nous ajustons à 1l avec de l'eau distillée. Le pH est ajusté à 5.6 – 5.8 avec du HCl ou du KOH avant d'ajouter l'agar. Le milieu ainsi préparé est porté à ébullition pour l'homogénéisation et la dissolution de la gélose. La stérilisation du milieu de culture est faite par autoclavage à 120°C pendant 20mn.

#### 2-4 Mise en culture

La mise en culture de fragments de germes et de microtubercules, dans des tubes à essai de 20cm contenant 20ml de milieu de culture, est effectuée sous hotte à flux laminaire stérile en suivant

toutes les conditions classiques d'asepsie. Après 5 semaines de culture, les vitroplants obtenus (G1) sont de nouveau coupés en boutures uninodales et placées de nouveau dans d'autres tubes contenant un milieu de culture frais de même composition pour l'obtention de la G2. Nous n'avons utilisé que la première et la deuxième génération tout au long de l'expérimentation.

### 2-5 Conditions de culture.

Les tubes ensemencés sont placés dans un phytotron à une photopériode de 13 heures et une température de 24°C selon le protocole de Masson (1987).

## III- CALLOGENESE

### 3-1 Matériel végétal

Nous avons utilisé différentes origines d'explants, il s'agit de :

- Fragments de tubercules sous forme de fines tranches de 5 mm de diamètre prélevées sur la zone périphérique (cortex) et la zone centrale (moelle).
- Microtubercules coupés en disque de 4mm de diamètre.
- Entre nœuds prélevés sur des vitroplants de la G1 après 5 semaines de culture.
- Feuilles prélevées sur les même vitroplants et coupées en deux.

### 3-2 Milieu de culture

Nous avons utilisé le même milieu de base MS (1962) auquel nous avons ajouté différentes concentrations de régulateurs de croissance suite au protocole de Ashari et Villiers (1998) tableau 5.

Tableau 5 : *Balances hormonales utilisées pour la callogénèse.*

	<b>2,4D mg/l</b>	<b>BAP mg/l</b>
<b>Traitement1 (T1)</b>	1	2
<b>Traitement2 (T2)</b>	1	1
<b>Traitement3 (T3)</b>	1	0.5
<b>Traitement4 (T4)</b>	0.5	1
<b>Traitement5 (T5)</b>	0.5	0.5

Après autoclavage à 120°C pendant 20mn, le milieu est coulé dans des boites de Pétri stériles à raison de 20 ml/ boite.

### 3-3 Mise en culture

Tous les explants sont placés dans les boites de pétri contenant le milieu de callogénèse, à raison de 5 explants/boite, et mis en incubation à une température de 25°C, obscurité totale. Le repiquage sur milieu frais se fait tous les 15 jours.

Il est à signaler que les fragments de tubercules ont été préalablement désinfectés avant leur mise en culture.

#### IV- ISOLEMENT DE PROTOPLASTES

##### 4-1 Matériel végétal

Nous avons utilisé le mésophylle foliaire de vitroplants de la première génération ainsi que les cals d'entrenœud, comme source de protoplastes.

##### 4-2 Milieu de macération.

L'isolement de protoplastes a été effectué dans un milieu de macération constitué du milieu nutritif MS (1962), additionné d'un agent osmotique, le mannitol, et des enzymes pecto-cellulasiques, (cellulase et pectinase), à différentes concentrations selon le tableau3. Le pH du milieu de macération est ajusté à 5,2.

Fig.1: Protocole expérimental pour l'optimisation des concentrations de l'agent osmotique et des enzymes de macération.

<b>Mannitol M/I</b>		
<b>M1</b>	0.4	
<b>M2</b>	0.6	En présence de:
<b>M3</b>	0.8	1% cellulase
<b>M4</b>	1	1% pectinase
<b>M5</b>	1.2	

↓

<b>Cellulase</b>		
<b>C1</b>	1 %	En présence de :
<b>C2</b>	2 %	0.6M Mannitol pour mésophylle
<b>C3</b>	3 %	0.8M Mannitol pour cals
<b>C4</b>	4 %	1% pectinase
<b>C5</b>	5 %	

↓

<b>Pectinase</b>		
<b>P1</b>	0.5 %	En présence de :
<b>P2</b>	1 %	0.6M Mannitol pour mésophylle
<b>P3</b>	1.5 %	0.8M Mannitol pour cals
<b>P4</b>	2 %	1% Cellulase pour mésophylle 3%cellulase pour cals

##### 4-3 Traitements effectués.

Nous avons placé des feuilles entières, coupées en petits fragments ne dépassant pas 2mm de dimension ou des cals friables et entiers dans des Erlenmeyers, contenant 20 ml de milieu de macération à raison de 0.5g de matière fraîche/10ml de solution de macération. Le tout est placé sous agitation rotative. Les effets des facteurs suivants sont étudiés successivement.

- Effet de la concentration du mannitol.
- Effet de la concentration de la cellulase.
- Effet de la concentration de la pectinase.
- Effet de la vitesse d'agitation.
- Effet de la température de macération.
- Effet de l'âge des feuilles.
- Effet de la préplasmolyse.

#### **4-4 Purification**

Après avoir optimisé les conditions d'isolement, nous avons entamé la purification de la suspension de protoplastes. Nous avons d'abord éliminé les gros débris par filtration sur toile à bluter, puis nous avons éliminé les enzymes par 3 centrifugations successives à 100xg pendant 10mn dans une solution de rinçage constituée du milieu MS additionné de 0.6M de mannitol. En dernier lieu, nous avons tenté de séparer les protoplastes des débris fins par la méthode de séparation densimétrique sur gradient de saccharose sur une couche de saccharose, à des concentrations étudiées, dont le principe est le suivant : 2ml de solution de saccharose d'une concentration choisie sont placés dans des tubes puis additionnés de 1ml de suspension de protoplastes. Une centrifugation à 150xg pendant 5mn s'en suit.

#### **4-5 Méthode de comptage de protoplastes.**

Nos résultats sont exprimés en rendements, c'est à dire le nombre de protoplastes par gramme de matière fraîche du matériel végétal et par ml, déterminé par comptage sur une cellule Malassez. Nous avons effectué pour chaque essai 3 à 5 répétitions.

#### **4-6 Protocole expérimental.**

Notre protocole expérimental a été effectué selon le tableau 7.

#### **4-7 Analyse statistique.**

L'ANOVA a été adoptée pour l'analyse statistique de nos résultats afin d'étudier l'effet des différents traitements. En cas de différence significative, nous avons complété notre analyse par la comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman et Keuls au seuil de 5% à l'aide du logiciel STATITCF.

**Tableau7: Protocole expérimental**

	<b>Mannitol</b>	<b>Cellulase</b>	<b>Macerozyme</b>	<b>Vitesse d'agitation</b>	<b>Température</b>	<b>Age des feuilles</b>	<b>Forme des feuilles</b>	<b>Pré plasmolyse</b>
<b>Essai ai1</b>	<b>Variable 0.4-0.6-0.8-1-1.2M/l</b>	Fix= 1%	Fixe=0.5%	Fixe=50rpm	Fixe=25°C	Tout age confondu	F. entières	SANS
<b>Essai1</b>	Fix= 0.6 M/l feuilles 0.8M/l calcs	<b>Variable 1-2-3-4-5%</b>	Fixe=0.5%	Fixe=50rpm	Fixe=25°C	Tout age confondu	F. entières	SANS
<b>Essai2</b>	Fix= 0.6M/l feuilles 0.8M/l calcs	Fix= 1% feuilles 3% calcs	<b>Variable 0.5-1-1.5-2%</b>	Fixe=50rpm	Fixe=25°C	Tout age confondu	F. entières	SANS
<b>Essai3</b>	Fix= 0.6M/l feuilles 0.8M/l calcs	Fix= 1% feuilles 3% calcs	Fix= 0.5%	<b>Variable : 50-100-150-200</b>	Fixe=25°C	Tout age confondu	F. entières	SANS
<b>Essai4</b>	Fix= 0.6M/l feuilles	Fix= 1% feuilles	Fix= 0.5%	<b>Fix= 100rpm</b>	<b>Variable: 20-25-30°C</b>	Tout age confondu	F. entières	SANS
<b>Essai5</b>	Fix= 0.6M/l feuilles	Fix= 1% feuilles	Fix= 0.5%	Fix= 100rpm	Fix= 30°C	<b>Variable : 1-2-4 semaine</b>	F. entières	SANS
<b>Essai6</b>	Fix= 0.6M/l feuilles	Fix= 1% feuilles	Fix= 0.5%	Fix= 100rpm	Fix= 30°C	Fix= 1 à 2 semaines	<b>Variable : F. entières - F. coupées</b>	SANS
<b>Essai7</b>	Fix= 0.6M/l feuilles	Fix= 1% feuilles	Fix= 0.5%	Fix= 100rpm	Fix= 30°C	Fix= 1 à 2 semaines	Fix= F. coupées	<b>Variable : Avec Sans</b>
<b>Essai8</b>	Fix= 0.6M/l feuilles	Fix= 1% feuilles	Fix= 0.5%	Fix= 100rpm	Fix= 30°C	Fix= 1 à 2 semaines	Fix= F. coupées	Fix=AVEC

## **I- LA MICROPROPAGATION.**

Dans cet essai, notre but est de disposer régulièrement de matériel végétal (vitroplants) frais et de bonne qualité c'est à dire un taux de reprise important, un nombre élevé de feuilles par plant pour l'isolement de protoplastes et un diamètre de tige adéquat pour la callogénèse.

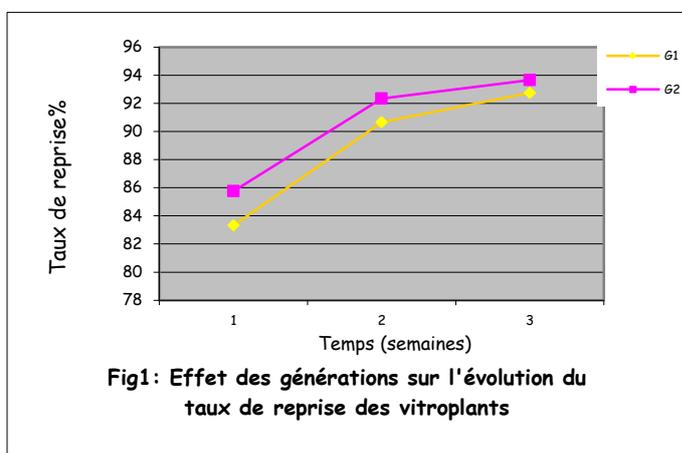
Pour cela, nous avons comparé, après 5 semaines de culture, des vitroplants de la G1 (germes prélevés sur des tubercules, planche1A), de la G2 (boutures uninodales) et ceux des microtubercules,

### **1-1 Effet des générations sur le taux de reprise des vitroplants:**

Après deux jours de culture sur le milieu MS(1962) et à une photopériode de 13h, plus de 50% des explants de la G1 et de la G2 ont commencé à émettre des ébauches racinaires. Au troisième jour et en absence de contamination, le taux de reprise atteint 80% sans qu'il y ait une différence entre les deux générations.

En revanche, le développement des bourgeons a marqué un léger retard de la G1 par rapport à la G2, au troisième jour de culture 40% des bourgeons de la G2 ont commencé à se développer en des tiges fines portant des feuilles simples, alors que ceux de la G1 n'ont débouffé qu'au bout de 4 jours (16%), et les tiges formées étaient épaisses et portaient des feuilles composées de grande taille (planche1B-C)

Le maximum de reprise a été enregistré après 20 jours de culture. Selon la figure 1, l'effet génération sur la réactivité des explants n'est pas significatif, le taux de reprise des explants des 2 générations (G1 et G2) est quasiment identique. Il est de 92.75% et 93.66% respectivement pour la G1 et la G2,



### **1-2 Effet des générations sur le diamètre des tiges des vitroplants:**

Contrairement au paramètre précédent, nous avons remarqué que l'effet des générations sur la croissance des tiges est très significatif.

Malgré le taux important de réactivité, les tiges des explants de la G2 étaient très fines, leur diamètre n'a pas dépassé 1mm au début de leur formation, c'est à dire au stade 3 jours.

**A**



**B**



**C**



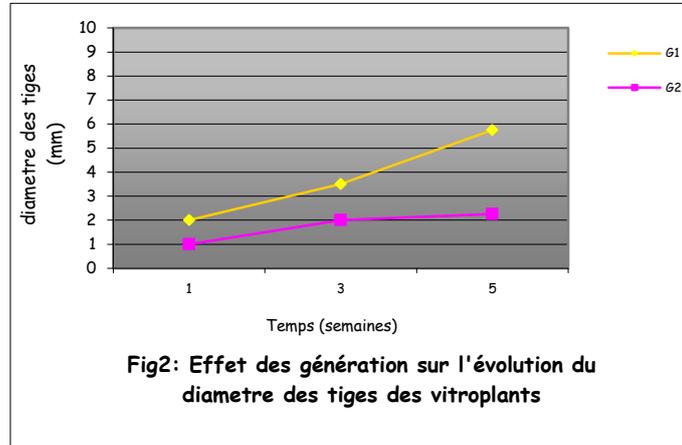
## **Planche1 : Multiplication à partir des germes de tubercules**

**A:** introduction des germes de tubercules

**B et C:** développement de vitroplants issus de germes

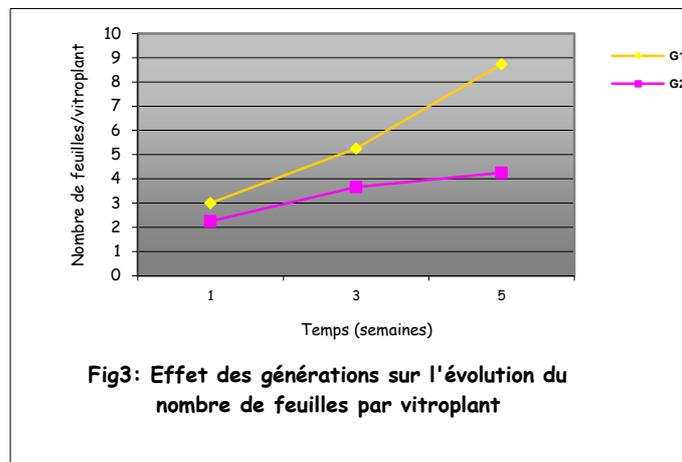
Ces tiges sont restées grêles, leur développement était très ralenti (fig2) et elles n'ont atteint que 2.25mm de diamètre, en moyenne, au bout de 5 semaines de culture. Nous avons noté aussi qu'elles étaient très longues par rapport à celles de la G1

D'autre part, les tiges de la G1 ont manifesté une croissance très rapide. La figure 2 montre l'évolution de ce paramètre en fonction du temps. Nous avons noté qu'au premier jour de leur apparition les tiges avaient déjà un diamètre important, de l'ordre de 1.5mm. A la cinquième semaine de culture, elles étaient dressées, robustes avec un diamètre de 5.66mm en moyenne (planche2)



### 1-3 Effet des générations sur le nombre de feuilles des vitroplants:

Nous avons évalué ce paramètre par le comptage de feuilles par plant tout au long de l'essai, nous avons remarqué qu'il y a une différence significative entre les deux générations (figure 3)



Alors que les plants de la G1 comportent de grandes feuilles, composées, bien étalées, avec un nombre allant jusqu'à 10, avec une moyenne de 8.75 feuilles/vitroplant après 5 semaines de culture, les plants de la G2, quant à eux, ne comportent que de petites feuilles, simples, de nombre très réduit, avec une moyenne de 4.25 feuilles/vitroplant.

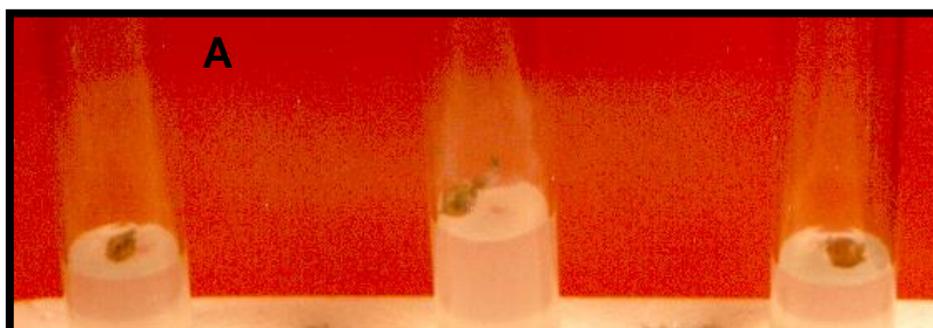
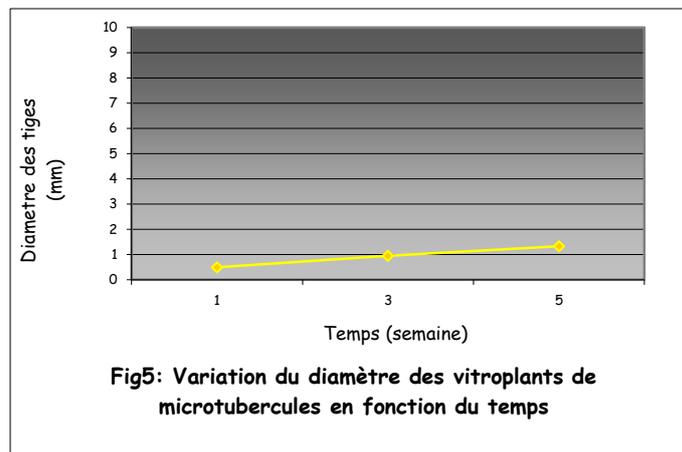
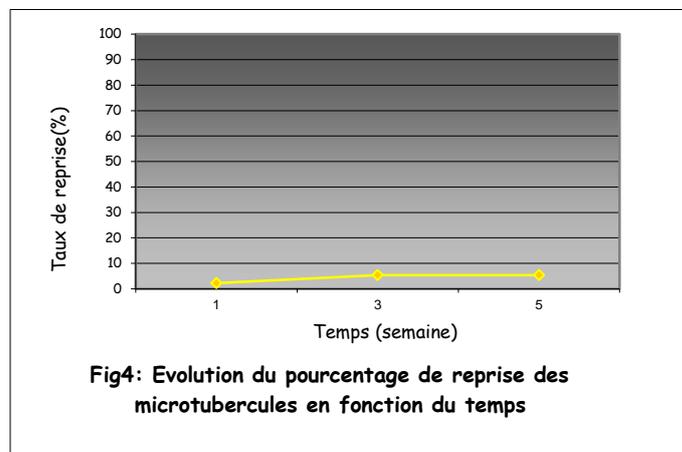


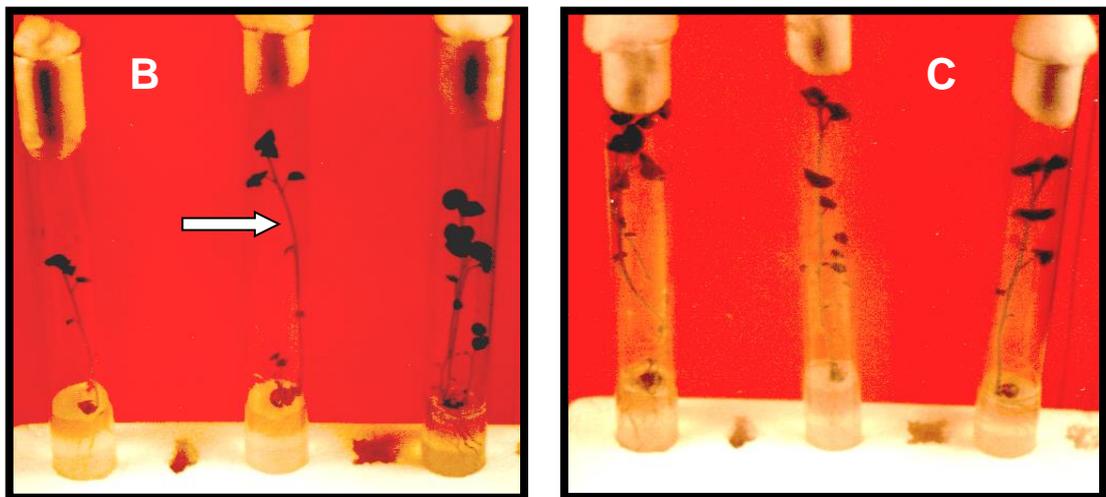
***Planche2: Vitroplant de la G1 âgé de 5 semaines  
(Grandes feuilles, composées, bien développées à nombre élevé, tige à  
diamètre important)***

Notons que ce résultat concorde avec celui du paramètre précédent (diamètre des tiges), lorsque les entre-nœuds sont très longs le nombre de feuilles reste réduit.

#### **1-4 les microtubercules:**

Dans les mêmes conditions de culture que les vitroplants de la G1 et la G2, les microtubercules ont manifesté des résultats variables. La reprise était très lente avec un taux ne dépassant pas les 10% (fig4), Le nombre de feuilles et le diamètre des tiges étaient similaires à ceux de la G2 (fig.5,6), de plus, les microtubercules ont donné un fort pourcentage de vitroplants à morphologie anormale (planche3)

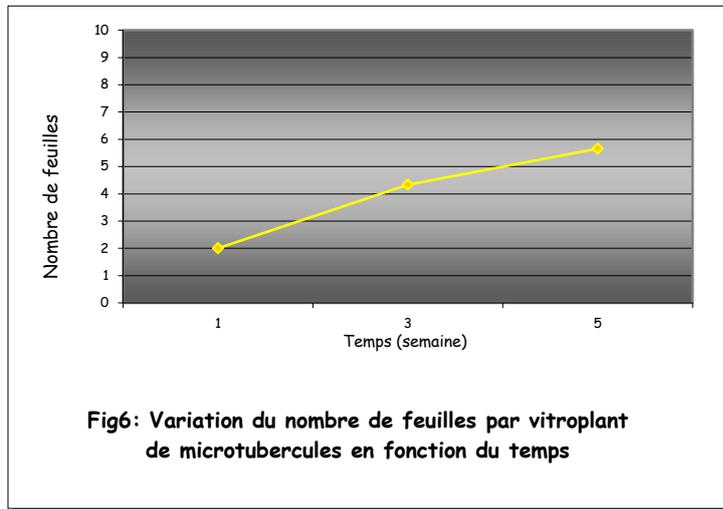




### **Planche3 : Micropropagation de vitroplants à partir de microtubercules**

***A:** Mise en culture de microtubercules*

***B et C:** Développement de vitroplants, après 5 semaines de culture, à partir de microtubercules (tiges légèrement étiolées, feuilles simples à nombre réduit)*



### **1-5 Bilan :**

Suite aux résultats obtenus au niveau de cette partie, nous pouvons dire que les microtubercules ont eu une reprise très lente, donc un nombre très insignifiant de vitroplants obtenus, et ceux de la G2 ont montré un développement médiocre des tiges et des feuilles. Cela nous a amenée à les éliminer et ne garder que la G1 pour le reste de l'essai (planche4).



**Plache4 : Développement des vitroplants de la G1 après 5 semaines de culture**

## **II- CALLOGENESE.**

La bonne qualité des cals et leur quantité sont la première garantie pour l'obtention de protoplastes. L'objectif de cette étape est de mettre au point une balance hormonale adéquate pour l'obtention de maximum de cals friables en un temps réduit, ainsi nous pourrions assurer la préparation de protoplastes avec autant de répétitions possibles pour la fiabilité des résultats. Pour cela, nous avons comparé l'effet de 5 balances hormonales appliquées sur 5 types d'explants de pomme de terre.

### **2-1 Réactivité des explants:**

La réactivité des explants aux milieux de callogénèse diffère selon leurs origines.

- Les fragments de tubercules ont réagi par un gonflement et un léger blanchiment de leur surface suivie de l'apparition de petits amas de cals sur leurs bordures.
- Les microtubercules n'ont eu aucune réaction, et ont fini par se dessécher.
- Les feuilles entières n'ont eu de réaction que sur le pétiole, alors que les feuilles coupées ont présenté des cals cicatricielles sur toutes leurs sections sans qu'il y ait un développement ultérieur important.
- Quant aux entre-nœuds, la réactivité aux différents milieux de callogénèse a été très distinguée, elle a commencé par l'apparition d'amas de cals sur les deux extrémités des fragments et cela dès les premiers jours de leur mise en culture, puis ces cals ont envahi la totalité de l'explant en une semaine. En outre, nous avons remarqué que certains explants courts ont éclaté suite à la pression du cal qui a été initié à l'intérieur même de l'entre nœud.

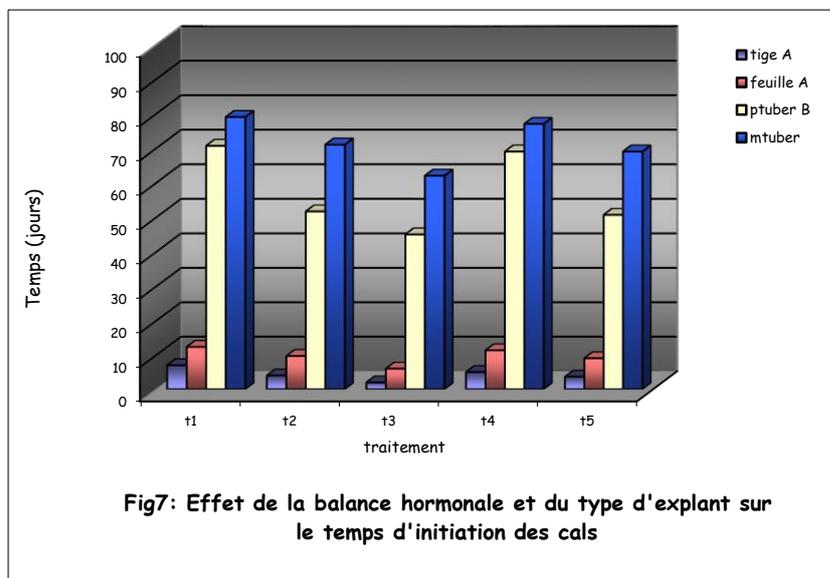
### **2-2 Temps d'initiation de cals:**

Le temps d'initiation des cals est déterminé par le jour où nous avons remarqué la première apparition de cals sur l'explant.

L'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif entre les traitements hormonaux et les types d'explants. En effet, nous avons remarqué que les entre nœuds ont eu une réactivité presque immédiate (2 jours) après leur mise en culture sur le milieu T3, et un peu plus lente sur le T1 (7 jours).

Les feuilles ont pris un peu plus de temps pour réagir, ce n'est qu'au bout de 6 jours que la première réaction a eu lieu sur le T3 et 12 jours sur le T1.

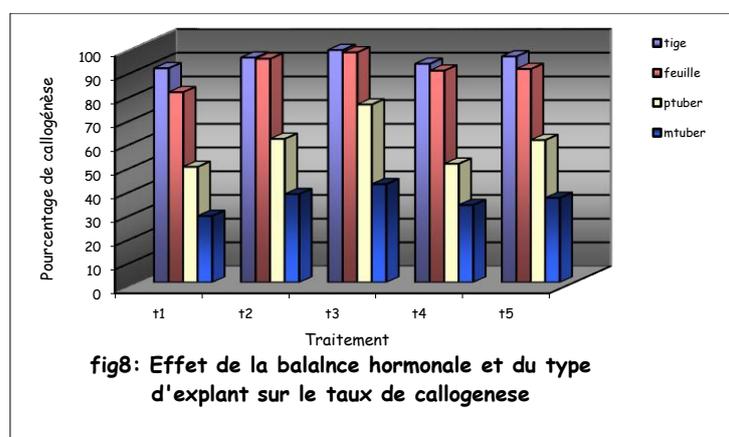
Quant aux fragments de tubercules, l'initiation de cals a été très lente, jusqu'à 45 jours de culture sur T3. De plus, nous avons noté que les deux origines n'ont pas réagi en même temps, la zone périphérique a devancé la zone médiane de 17 jours, c-à-d que la première réaction de la zone médiane n'a eu lieu qu'après 62 jours de culture sur le T3 (fig7).



### 2-3 Taux de callogénèse:

Ce paramètre est exprimé par le pourcentage de cals produits à la dernière réaction pour chaque type d'explant et par traitement.

Tout comme le paramètre précédent, la figure 5 montre l'effet très hautement significatif du type d'explants et des traitements sur le taux de callogénèse.



La callogénèse a été à son maximum pour les entre nœuds sur le T3 avec 98% (planche5) et nous avons remarqué que les 2%, qui n'ont pas réagit, concernent les explants de tiges très fins qui se sont desséchés dès les premiers jours de culture. De même, les feuilles ont présenté un fort pourcentage de cals produit, 97%, et sont classées dans le même groupe homogène que les entre nœuds selon le test de Newman et Keuls.

**A**



**B**



**C**



**Planche5 : Callogénèse sur entre nœuds en T3(2.4D/BAP=2)**

**A:** *Début de formation de cals au niveau des extrémités des entre nœuds*

**B:** *Cals en développement.*

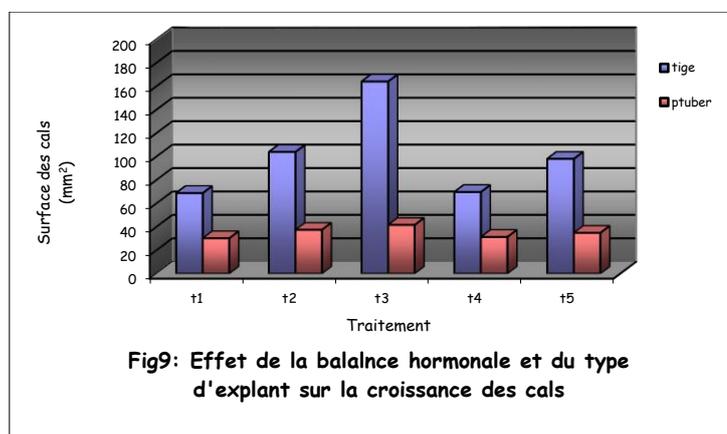
**C:** *Croissance intense de cals*

En ce qui concerne les explants de tubercules, ceux de la zone médiane n'ont pas atteint les 35% tous traitements confondus, alors que les fragments de la périphérie ont donné un taux de callogénèse moyen sur le T1, 48.7%, à élevé sur le T3, 75 %.

#### **2-4 Croissance des cals:**

Ce paramètre a été estimé par la mesure de la surface des cals après 15 jours de culture. Etant donné que la croissance des cals des feuilles et de la zone médiane des tubercules a été insignifiante voire même nulle, nous n'avons gardé que les cals issus des entre nœuds et ceux de la zone périphérique des tubercules.

L'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif entre ces deux origines et entre les traitements. En effet, et comme il a été signalé précédemment, le développement de cals d'entre nœuds a été spectaculaire, certains ont atteint 200mm<sup>2</sup> en 10 jours de culture sur le T3, alors que les cals de tubercules ont eu, selon la figure 6, une croissance très lente quelle que soit la balance hormonale utilisée, avec un maximum de 42.3 mm<sup>2</sup> sur le T3.



#### **2-5 Bilan:**

Malgré que la réactivité de tous les types d'explants en présence des différentes balances hormonales ait été observée, l'intensité de la callogénèse varie en fonction du type d'explants et du milieu (planche6,7). Elle était très bonne chez les entre-nœuds sur le T3, moyenne chez les explants de tubercules à médiocre chez les feuilles et les microtubercules.

Dans le but d'obtenir des cals friables en grande quantité et en un temps relativement réduit, le meilleur résultat a été obtenu avec les entre nœuds sur le T3 (2.4D/BAP = 2) pour lequel nous avons opté, les autres types de cals ont été éliminés pour la suite de l'expérimentation.

**A**



**B**



**C**

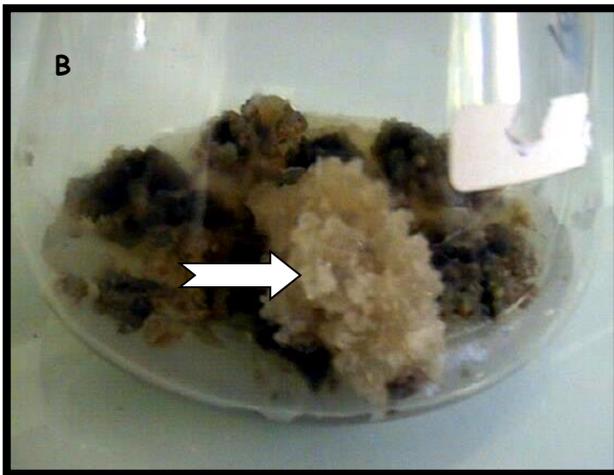


***Planche6 : Callogénèse sur entre nœuds en T2 (2.4D/BAP=1)***

***A*** : Introduction des entre nœuds.

***B*** : Cals en développement.

***C*** : Croissance importante de cals.



***Planche7: Callogénèse sur entre-nœuds en présence de fortes concentrations de BAP  
T1(2.4D/BAP=0.5)***

***A:*** Nécrose des cals et arrêt de division cellulaire (1mois de culture)

***B:*** Reprise de la callogénèse après une phase d'arrêt de croissance (trois mois de culture)

***C:*** Développement de cals.

### III ISOLEMENT DE PROTOPLASTES.

Nous avons adopté le protocole d'isolement de protoplastes selon les travaux de plusieurs auteurs (Lî et Constable, 1984 ; Masson *et al*, 1987 ; Erikson, 1987 ; Lindsay, 1987) sur la pomme de terre, puis, nous avons tenté d'optimiser les conditions d'isolement par rapport au génotype que nous avons utilisé "Désirée".

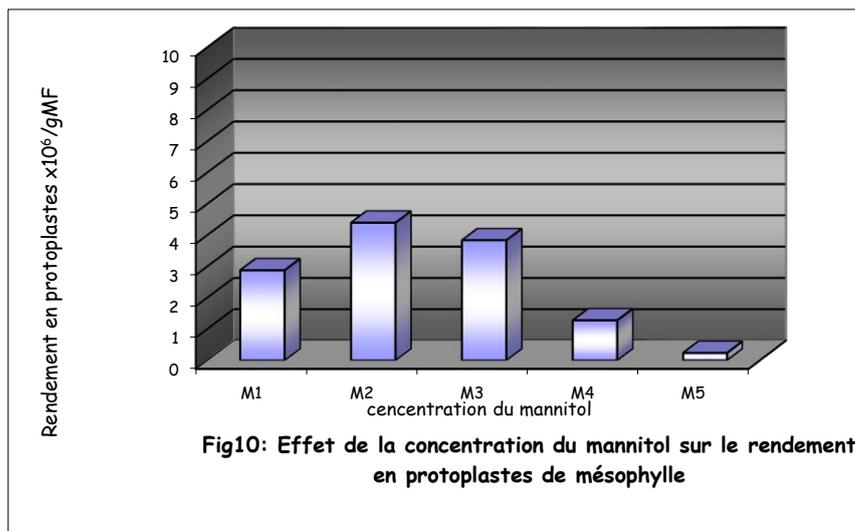
Dés les premières minutes d'incubation du matériel végétal dans la solution enzymatique et sous l'effet de l'agitation, tout traitement confondus, les tissus commencent à se désagréger (planche8a), en libérant d'abord des cellules isolées pourvues de leurs parois pectocellulosiques. Peu de temps après, nous avons remarqué la digestion des parois et la libération de quelques unités sphériques très régulières dans la solution : les protoplastes (planche8b, 9).

#### 3-1 Protoplastes de mésophylle foliaire.

##### 3-1-1 Effet du mannitol:

Nous avons utilisé le mannitol afin d'établir un potentiel osmotique négatif du milieu extracellulaire pour le maintien de l'intégrité cellulaire lors de la digestion des parois pectocellulosiques.

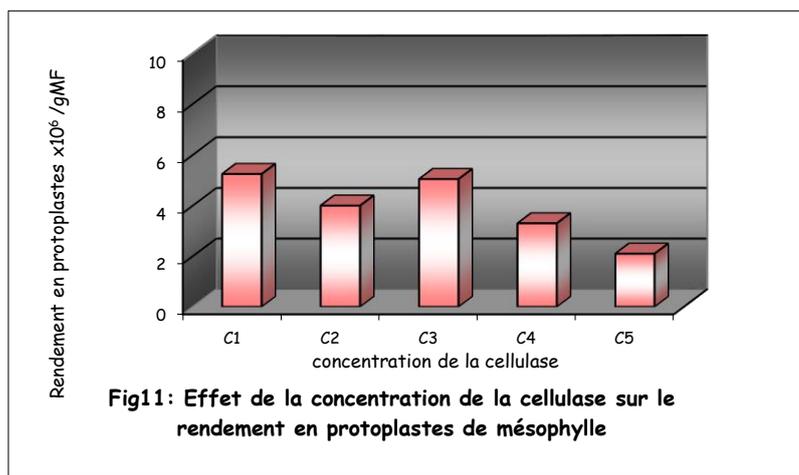
Comme le montre la figure10, l'effet de la concentration du mannitol est très hautement significatif, chaque niveau de concentration a formé un groupe homogène selon le test de Newman et Keuls. Les fortes concentrations, de l'ordre de 1 à 1.2M/l, donnent des rendements très réduits, voir insignifiants, de l'ordre de  $0,24 \cdot 10^6$  prot/gMF, et les protoplastes obtenus sont en mauvaise état. Le meilleur rendement ( $4,4 \cdot 10^6$  prot/gMF) est obtenu avec 0.6M/l de mannitol que nous avons retenu pour le reste de l'expérimentation.



### 3-1-2 Effet de la cellulase:

Une fois la concentration du mannitol fixée à 0.6M pour le mésophylle, nous avons fait varier la concentration de la cellulase de 1 – 2 – 3 – 4 – 5% en utilisant 1% de pectinase.

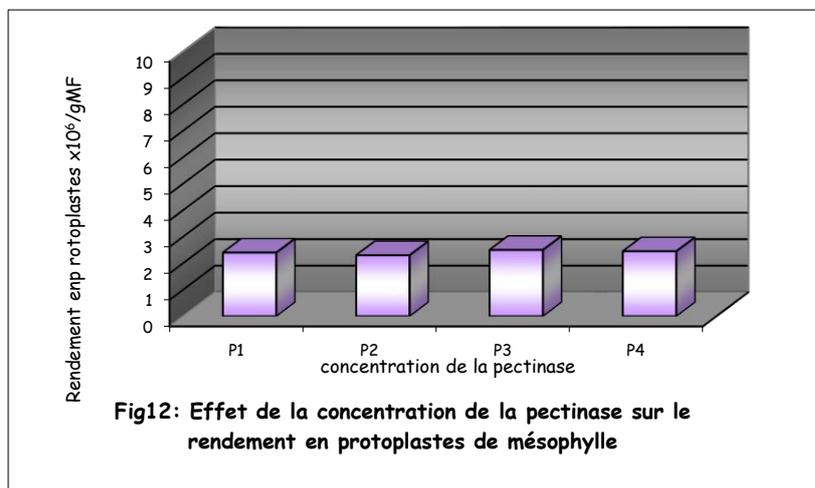
De même pour ce paramètre, l'effet de la cellulase est très hautement significatif. La figure 11 montre que les faibles rendements sont enregistrés suite à l'utilisation des fortes concentrations, de l'ordre de 4 et 5%, La concentration optimale qui est de 1% a donné un rendement de  $5,25 \times 10^6$  prot/gMF,



### 3-1-3 Effet de la pectinase:

Nous avons testé les concentrations : 0.5 – 1 – 1.5 –2% de pectinase en utilisant 1% de cellulase. Contrairement à l'effet de la cellulase, nous avons noté que la présence de la pectinase suffit pour dégrader la lamelle moyenne et donc désagréger le tissu et cela quelle que soit sa concentration.

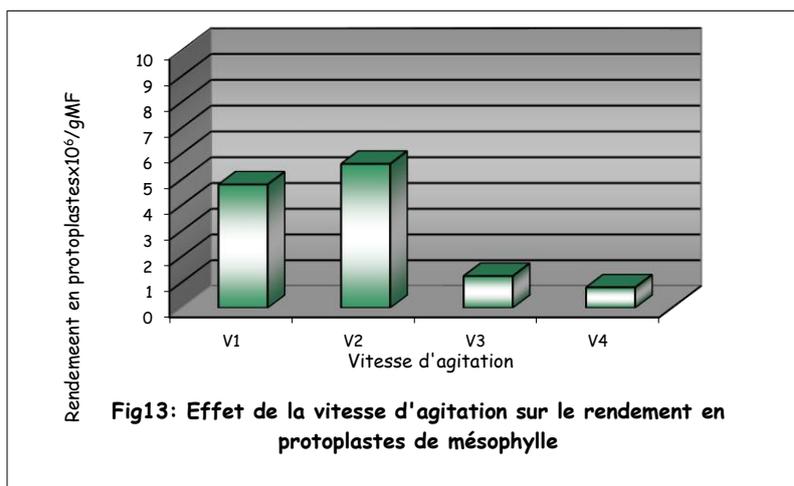
Selon la figure 12, aucune différence significative n'a été révélée entre les concentrations de pectinase, les rendements sont pratiquement les mêmes pour les différentes concentrations utilisées. Nous avons retenu, de ce fait, 1% de pectinase pour la suite de l'essai.



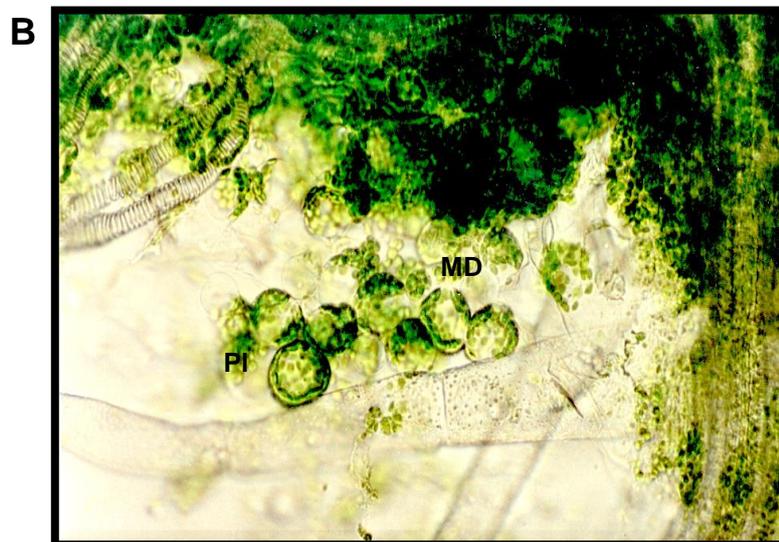
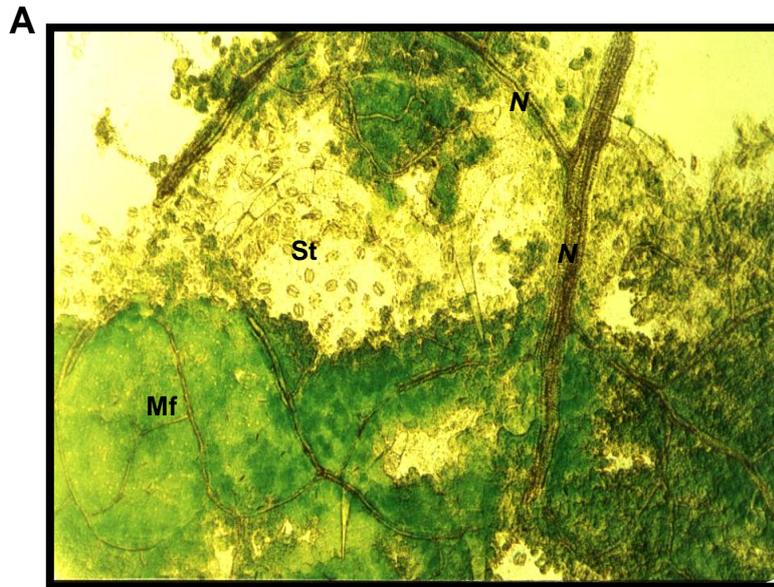
### 3-1-4 Effet de la vitesse d'agitation:

L'utilisation de l'agitation rotative lors de la macération permet un contact plus important des tissus avec la solution enzymatique et donc une meilleure libération de protoplastes formés.

Quatre vitesses d'agitation ont été testées: V1=50, V2=100, V3=150, V4=200rpm. L'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif entre les vitesses. La figure 13 montre que les



faibles vitesses (50 et 100rpm) ont donné des rendements rapprochés en protoplastes, de l'ordre de  $4,8 \times 10^6$  et  $5,6 \times 10^6$  prot/gMF, jusqu'à 5 fois plus importante que ceux obtenus suite à l'utilisation de grandes vitesses. Nous avons alors gardé la vitesse suivante : 100rpm pour l'isolement de protoplastes de mésophylle

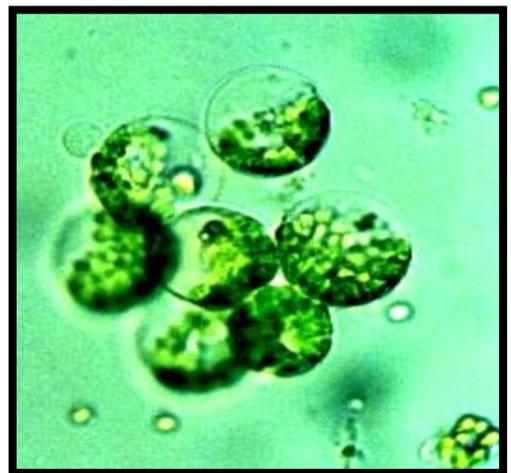
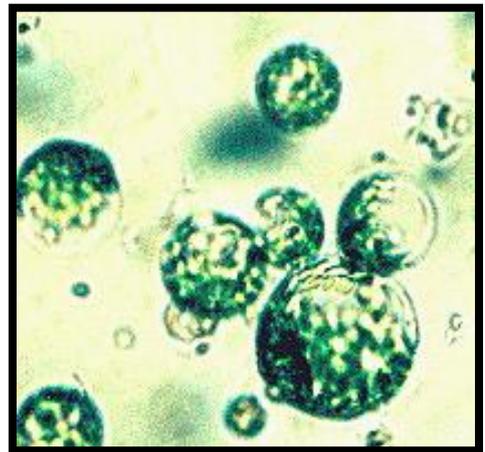
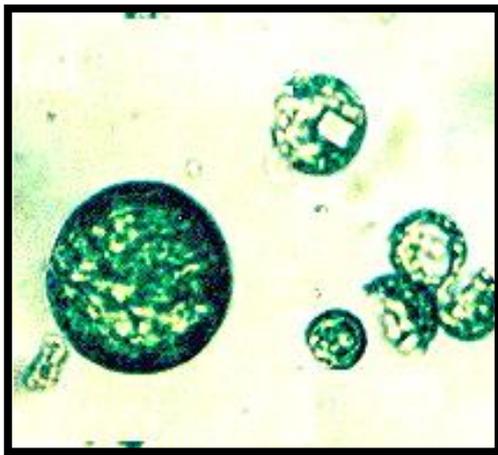


## Planche8 : Macération du tissu foliaire

**A** : début de digestion du mésophylle foliaire (G=3.2x12.5)

**B** : libération des premiers protoplastes lors de la macération (G=3.2x40)

(Mf: mesophylle foliaire, NP: nervure principale, NS: nervure secondaire, St: stomate,  
MD: mesophylle digéré, PI: protoplaste libéré)

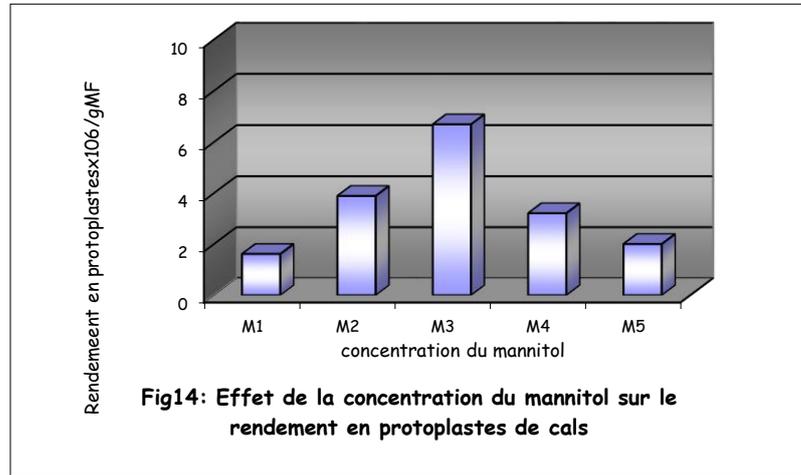


**Planche9 : Différentes dimensions de Protoplastes libérés**  
***(G=3.2x100)***

### 3-2 Protoplastes de cals

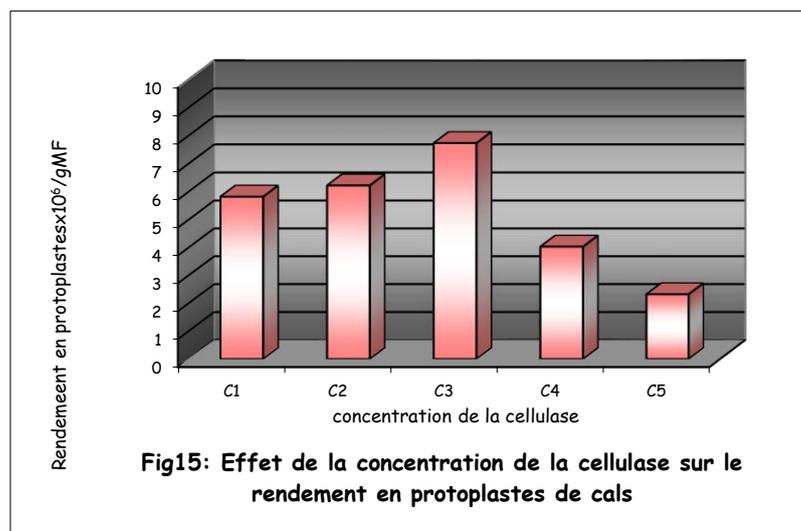
#### 3-2-1 Effet du mannitol:

Les résultats obtenus avec les cals comme source de protoplastes sont analogues à ceux du mésophylle. En d'autres termes, les fortes concentrations ainsi que la plus faible donnent de faibles rendements, comme le montre la figure 14. En revanche, la concentration optimale est différente de celle du mésophylle, elle est de 0.8M donnant un rendement de l'ordre de  $6.7 \times 10^6$  prot//gMF



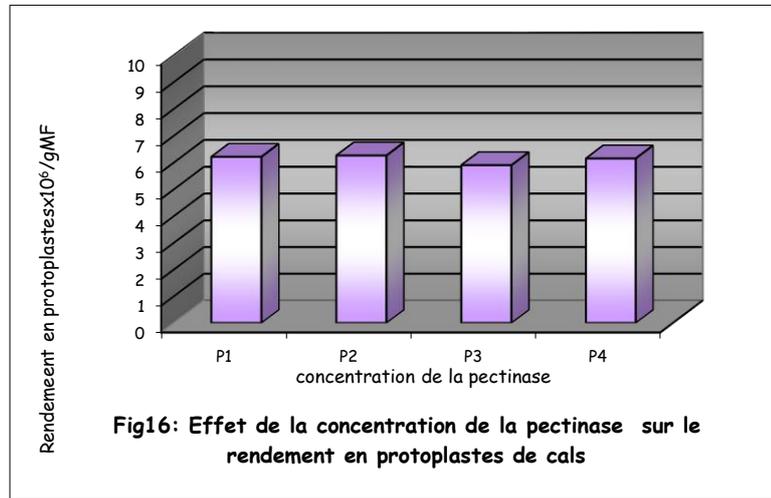
#### 3-2-2 Effet de la cellulase:

Après avoir fixé la concentration du mannitol à 0.8M, nous avons testé 1-2-3-4-5% de cellulase. L'analyse de la variance a révélé, comme pour le mésophylle, un effet très hautement significatif entre les différentes concentrations. La figure 15 montre que la C3 qui est de 3% donne le meilleur rendement de l'ordre de  $7.73 \times 10^6$  prot//gMF, alors que les fortes concentrations donnent des rendements beaucoup plus réduits.



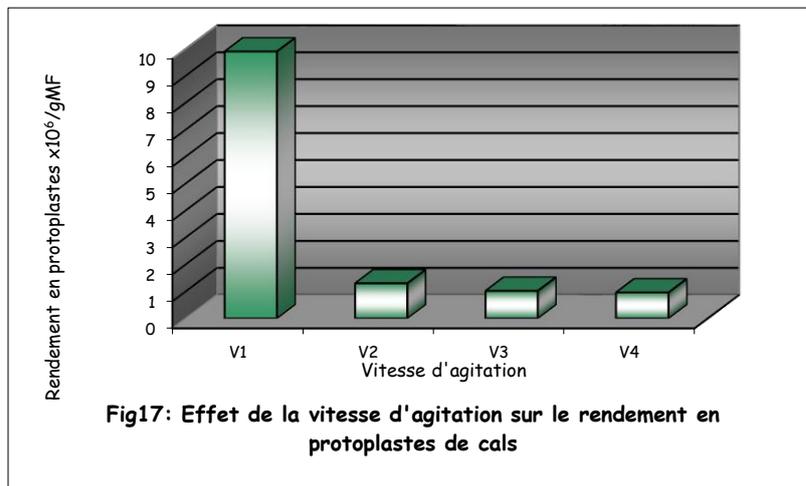
### 3-2-3 Effet de la pectinase:

Comme pour le mésophylle, les différentes concentrations de pectinase de l'ordre de 0.5-1-1.5 et 2% ont donné des rendements en protoplastes de cals quasiment identiques (fig16), aucun effet significatif n'a été révélé entre elles. Cependant, ces rendements sont plus importants que ceux obtenus avec le mésophylle ils sont compris entre 5 et  $6 \times 10^6$  prot//gMF



### 3-2-4 Effet de la vitesse d'agitation

Les différentes vitesses utilisées ont donné des résultats très distingués, et l'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif entre elles. La figure 17 montre qu'une seule vitesse, 50rpm, a donné un rendement important de l'ordre de  $9.9 \times 10^6$  prot//gMF. A partir de 100rpm les résultats sont insignifiants

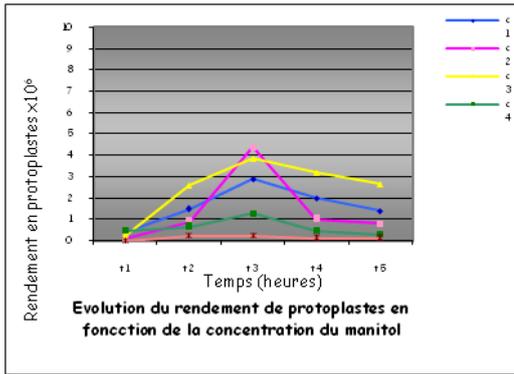


**3-5 Bilan:**

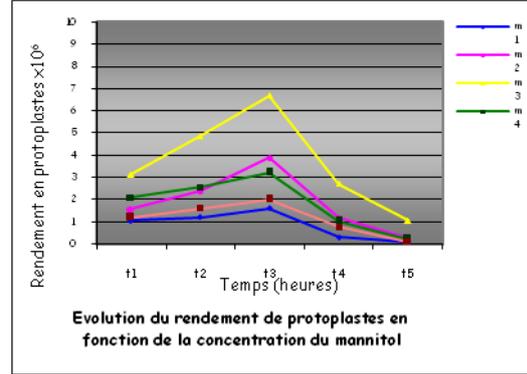
Suite aux résultats obtenus durant cette étape, nous pouvons dire que les conditions optimales de macération ne sont pas les mêmes pour les cals et le mésophylle. En d'autres termes, les deux sources de protoplastes présentent des exigences différentes : Alors que le meilleur rendement de protoplastes de cals est obtenu avec 3% de cellulase, 0,8M de mannitol et 50rpm, celui du mésophylle est obtenu avec 1% de cellulase, 0,6 M de mannitol et 100rpm.

D'autre part, selon la figure 18, nous avons noté que les rendements de protoplastes de cals ne sont pas stables, ils chutent de façon brutale dès la troisième heure de macération jusqu'à des valeurs insignifiantes, par contre ceux du mésophylle se maintiennent au cours du temps et la chute est progressive. Nous n'avons donc gardé que le mésophylle comme source de protoplastes pour la suite du travail.

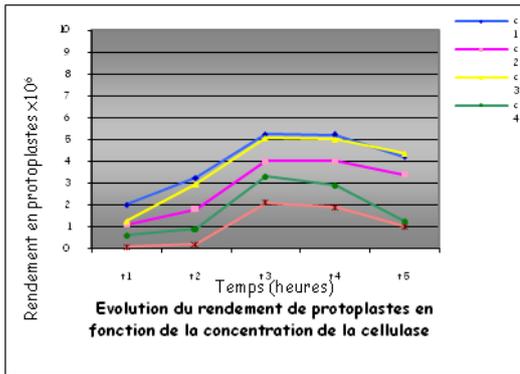
Néanmoins, malgré l'optimisation des concentrations des éléments essentiels à la macération, les rendements en protoplastes de mésophylle restent faibles, avec un maximum de  $5.05 \times 10^6$  prot/g MF, nous avons alors tenté de les améliorer en agissant sur les conditions physiques de la macération, tel que la température, l'âge et la forme des feuilles



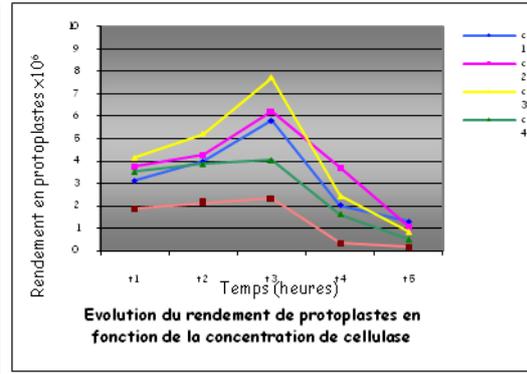
C=1%, P=1%



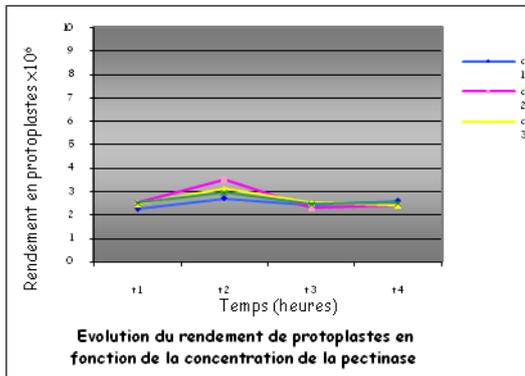
C=1%, P=1%



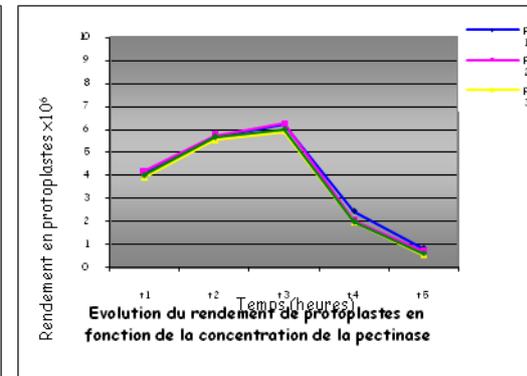
M=0.6M, P=1%



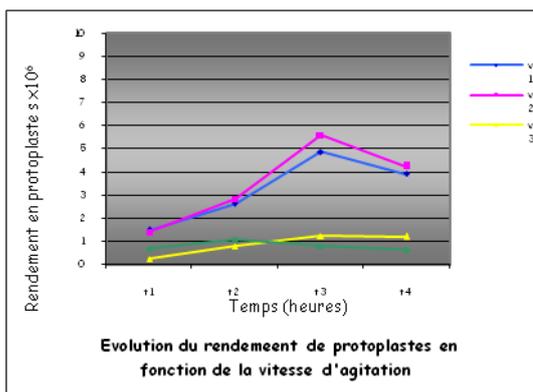
M=0.8, P=1%



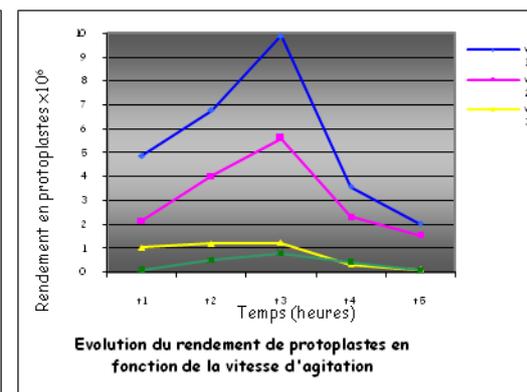
M=0.6, C=1%



M=0.8, C=3%



M=0.6, C=1%, P=1%



M=0.8, C=3%, P=1%

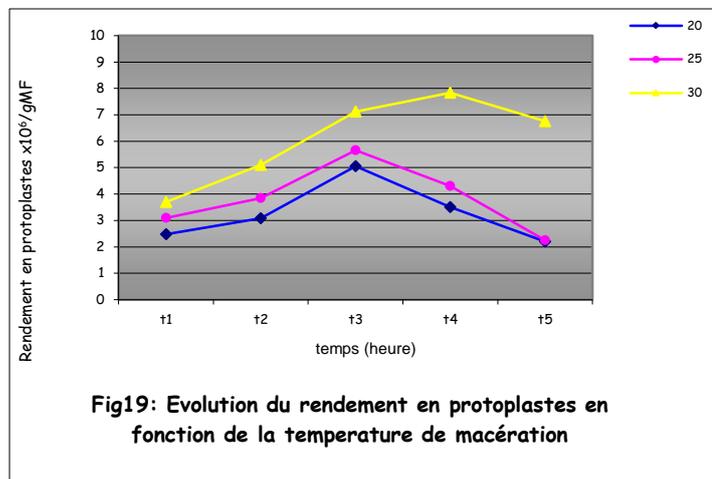
**Fig18 : Evolution des rendements de protoplastes en fonction de la composition de la solution de macération, du temps et de l'origine de l'explant**

### 3-6 Effet de la température de macération:

En conservant les conditions de macération fixées auparavant, nous avons testé les températures de 20, 25 et 30°C.

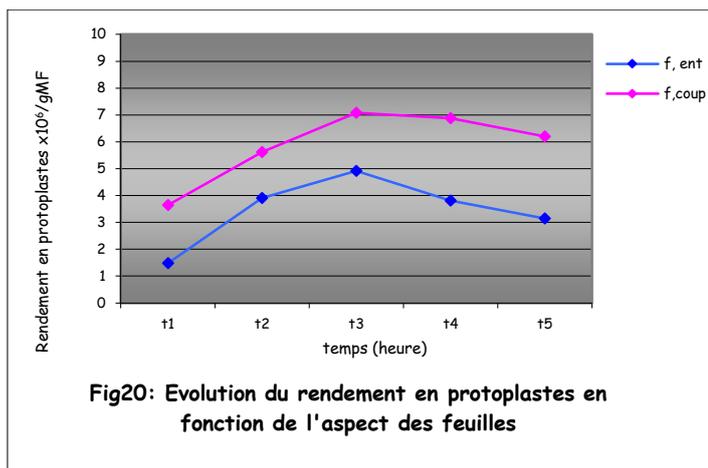
Une différence très hautement significative a été révélée entre ces températures. Deux groupes homogènes A et B sont formés selon le test de Newman et Keuls.

La figure 19 montre que les rendements sont plus importants à 30°C ( $7.83 \times 10^6$  prot/g MF), qu'à 20 et 25°C, où nous avons noté des rendements moyens de l'ordre de  $5.05$  et  $5.66 \times 10^6$  prot/g MF. Nous avons remarqué aussi qu'à 30°C la libération des protoplastes se prolonge jusqu'à la quatrième heure de macération, contrairement aux résultats de tout l'essai, où nous avons obtenu un maximum de protoplastes à la troisième heure, au-delà de cette période les rendements commencent à chuter.



### 3-7 Effet de la fragmentation des feuilles:

Dans le but d'augmenter le contact des tissus foliaires avec les enzymes, nous avons procédé à leur fragmentation en petits morceaux de 2mm de côté avant macération, et nous les avons comparés avec des feuilles entières (fig20).

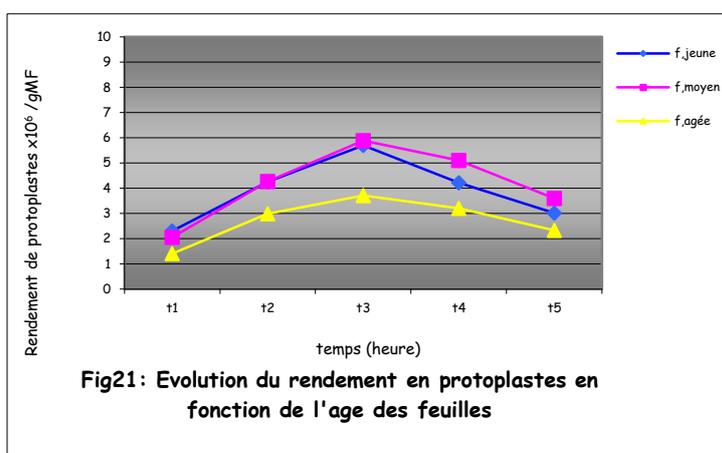


Une différence très hautement significative a été révélée entre les deux traitements (feuilles fragmentées, feuilles entières). A la troisième heure de macération, le rendement en protoplastes de feuilles découpées est beaucoup plus important,  $7.08 \times 10^6 \text{prot/gMF}$ , que celui des feuilles entières,  $4.92 \times 10^6 \text{prot/gMF}$ . Nous avons alors opté pour l'utilisation de feuilles découpées.

### 3-8 Effet de l'âge des feuilles:

Durant les différentes manipulations nous avons remarqué que les feuilles les plus âgées ne sont pas totalement désagrégées et certaines même restent intactes après 5 heures de macération. Nous avons alors pensé à tester ce paramètre en utilisant des feuilles découpées d'âges différents, de 1, 2, 4 semaines séparément.

L'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif entre les différents âges. Une nette amélioration des rendements a eu lieu (fig21), les feuilles d'une à deux semaines ont donné des rendements rapprochés de l'ordre de, respectivement,  $5.69 \times 10^6 \text{prot/gMF}$  et  $5.88 \times 10^6 \text{prot/gMF}$ . Alors que les rendements des feuilles âgées de 4 semaines étaient très réduits, de l'ordre de  $3.71 \times 10^6 \text{prot/gMF}$ .

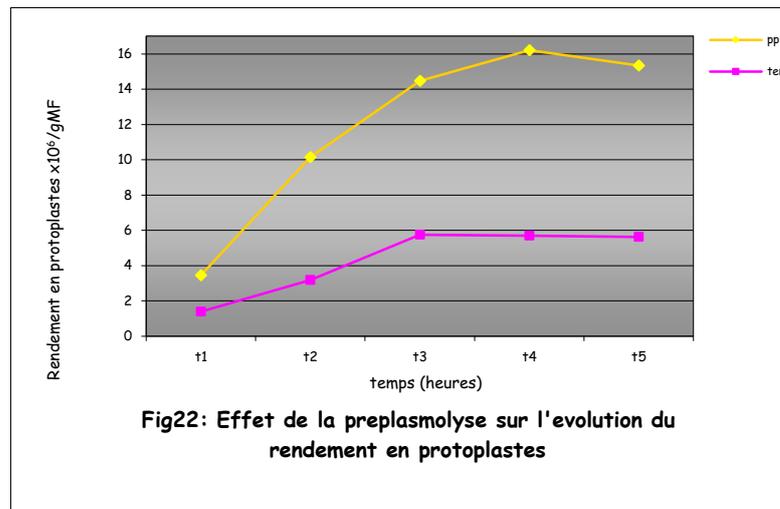


### 3-9 Effet de la préplasmolyse:

Nous avons procédé à la préplasmolyse des feuilles avant la macération dans le but de réduire les traumatismes exercés sur les cellules par la suppression de la paroi pectocellulosique.

Nous avons placé les tissus foliaires dans une solution contenant 20% de saccharose et 1.2% CaCl<sub>2</sub> pendant 60mn (Augé et Beauchesne 1990).

Les résultats obtenus sont très distingués. Nous avons noté que, non seulement les rendements ont été multipliés par 3, de l'ordre de  $16.22 \times 10^6$  prot/gMF contre  $5.2 \times 10^6$  prot/gMF pour le témoin (figure 22), mais aussi la libération de protoplastes se poursuit au-delà de la troisième heure sans autant qu'il y ait beaucoup de perte de protoplastes.



(pp= préplasmolyse)

(Tem=témoin)

## **VI- LA PURIFICATION**

Après avoir fixé les différents paramètres d'isolement de protoplastes, nous avons procédé à leur purification. Pour cela nous avons utilisé uniquement les protoplastes de mésophylle foliaire obtenu après préplasmolyse et isolés dans une solution de macération contenant 0.6 M/l mannitol, 1% cellulase, 1% pectinase sous agitation rotative de 100rpm à 30°C. Nous avons entamé la purification par l'élimination des gros débris à travers un tissu de 45µm de maille. Nous avons ensuite éliminé les enzymes par 3 centrifugations successives dans une solution de rinçages constituée du milieu MS tout en préservant la concentration de l'agent osmotique de la solution de macération.

L'étape la plus délicate est celle de l'élimination des débris fins (planche10). C'est à cette phase que nous avons tenté d'optimiser les conditions de purification

Millam et ses collaborateurs (1991) ont comparé les effets de 3 protocoles de purification de protoplastes de colza par:

1. Sédimentation à faible vitesse de centrifugation 150g dans 13% de mannitol
2. Flottaison dans une solution de saccharose
3. Sédimentation à faible vitesse de centrifugation dans du mannitol superposé à un volume équivalent de percol.

Le groupe de Millam n'a pas trouvé de grandes différences dans la quantité de protoplastes récupérés par ces 3 méthodes. Nous avons alors choisi la méthode de flottaison dans une solution de saccharose qui consiste à superposer 1ml de suspension de protoplastes sur 2ml de solution de saccharose à différentes densités.

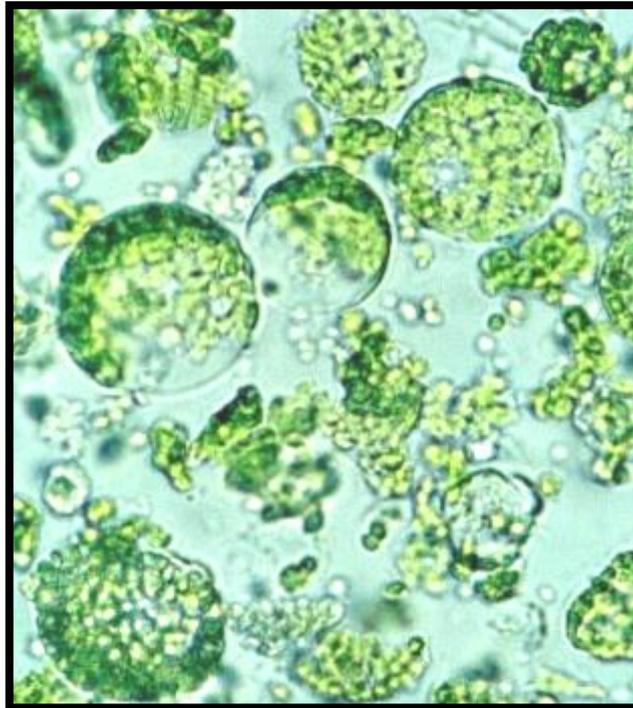
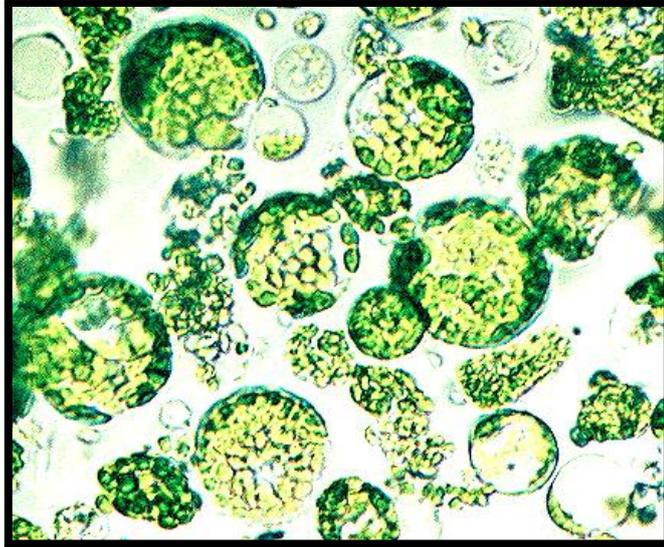
### ***A/ Gradient à fortes densités :***

Nous avons testé une purification sur une seule couche de saccharose (monocouche) de forte densité de l'ordre de 50 et 60% de saccharose avec une centrifugation de 150g pendant 5mn.

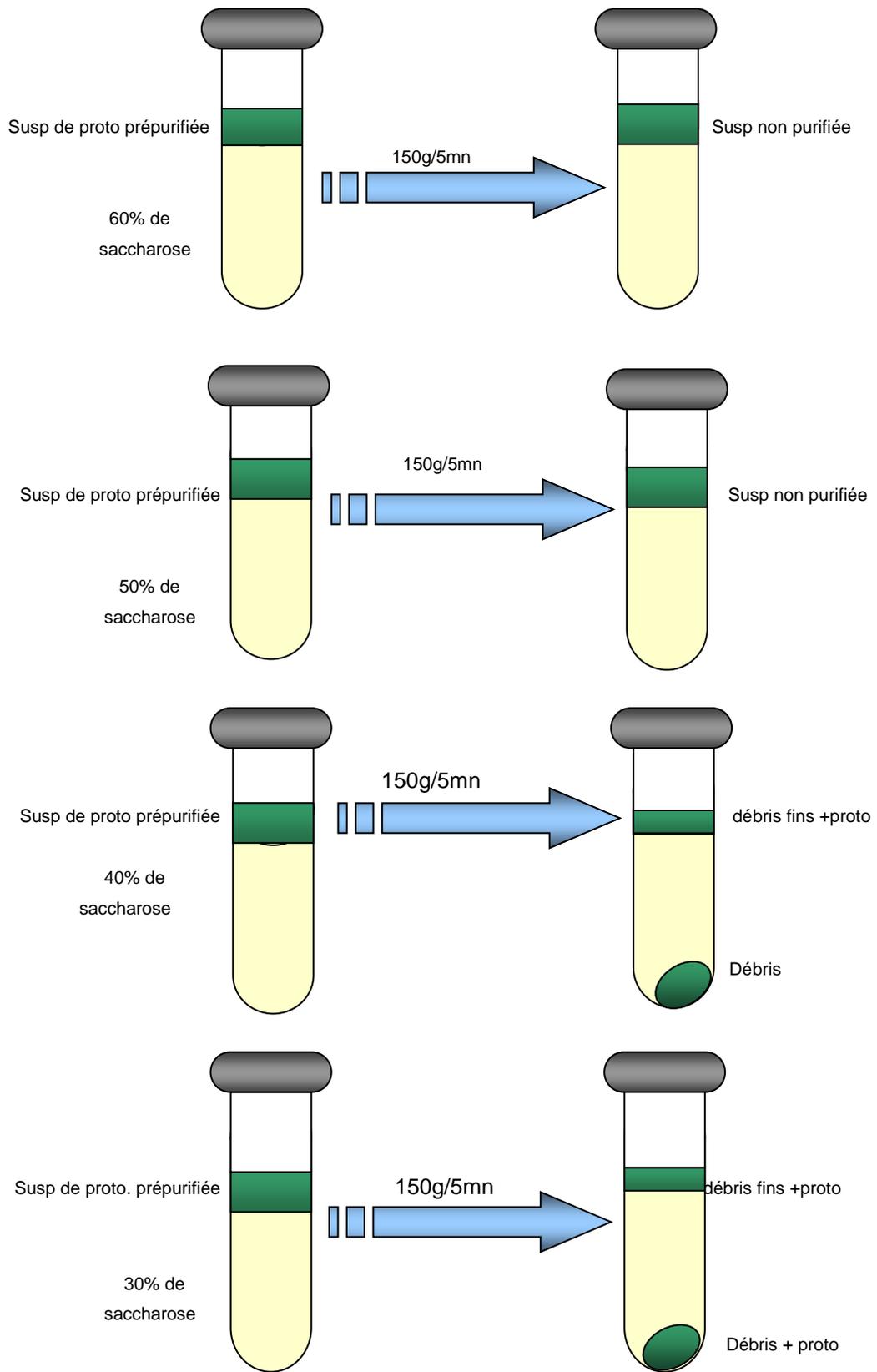
Les résultats que nous avons obtenus montrent que la purification n'a pas eu lieu (fig23). En effet, les protoplastes ainsi que les débris ne traversent pas les couches de saccharose aux fortes densités, aussi bien à 60% ou à 50%, et restent en surface. Nous avons donc refait l'expérience en réduisant les densités à 40% et 30% de saccharose.

La figure 23 montre aussi que pour les deux densités, il y a eu formation d'un culot au fond du tube, il est constitué uniquement de gros débris cellulaires à 40% de saccharose, et de gros débris plus quelque grands protoplastes en mauvaise état à 30%, et nous avons remarqué que la plupart des protoplastes sont en mauvais état et se trouvent concentrés à la surface de la couche de saccharose, mélangés aux débris fins.

Nous pouvons dire alors que cette gamme de densité ne permet pas la purification de la suspension de protoplastes du fait que les densités sont très fortes entraînant la destruction des protoplastes. Nous avons donc affiné cette gamme en utilisant de faibles densités de saccharose toujours en monochouche.



***Planche10 : Protoplastes prépurifiés (sans gros débris)  
(G=3.2x100)***



**Fig 23 : Effet des fortes densités de saccharose (monocouche) sur le degré de purification de protoplastes**

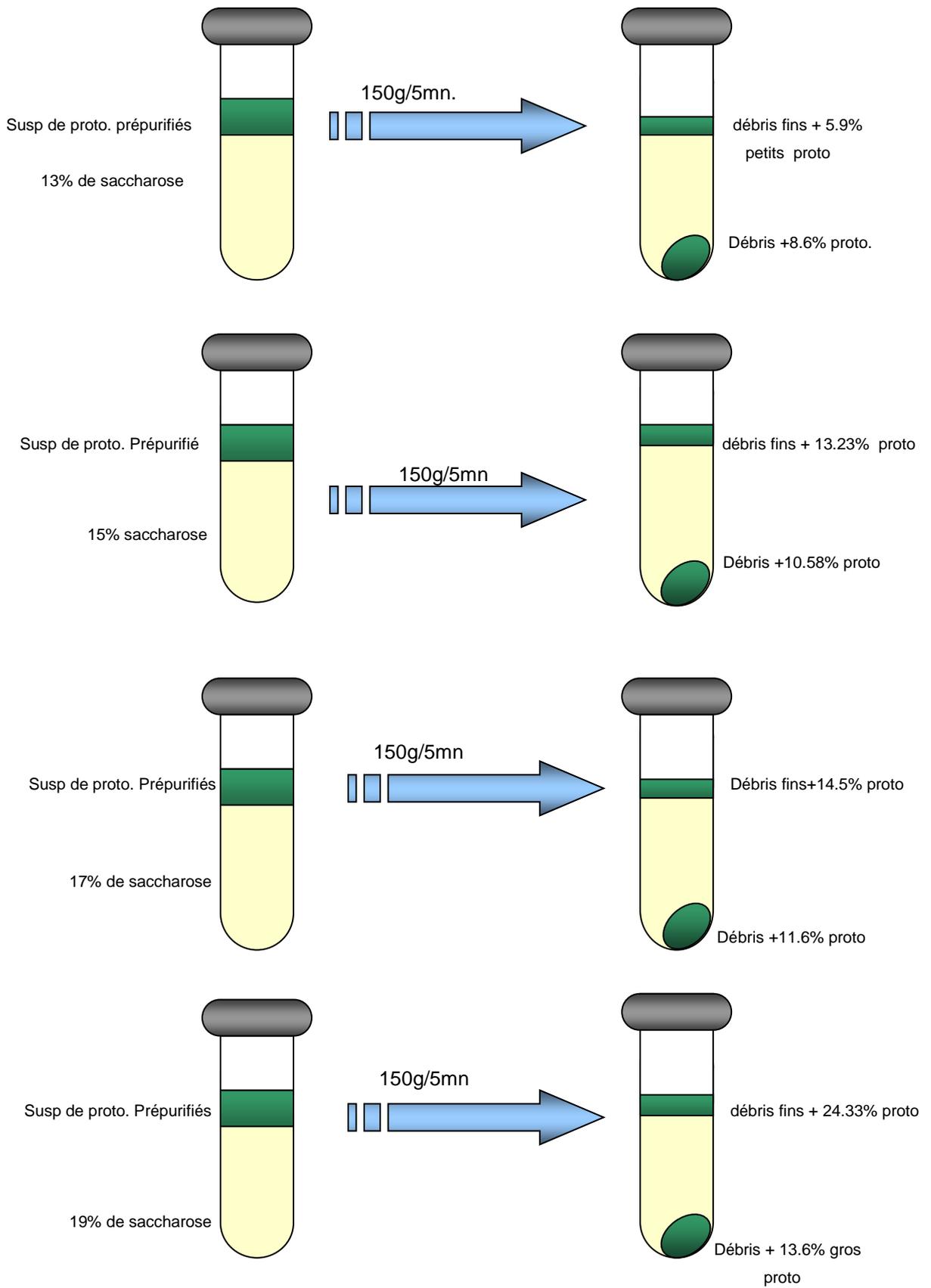
### ***B/ Gradient à faibles densités :***

Dans ces nouvelles conditions, nous avons distingué la séparation des protoplastes des débris fins à des taux cependant dissemblables. En effet, selon la figure 24, à 13% nous avons récupéré uniquement 5.9% de petits protoplastes mélangés aux débris fins à la surface de la couche, et 8.6% de protoplastes mélangés à ceux en mauvais état et aux débris ont formé un culot au fond du tube. Par contre à 15%, la purification est meilleure, nous avons obtenu 13.23% de protoplastes (petits et moyens) toujours mélangés aux débris fins à la surface de la couche de saccharose, et un culot formé de 10.58% de protoplastes mêlés à beaucoup de débris.

D'après ces résultats, nous pouvons dire que les faibles densités de saccharose permettent l'amélioration de la purification, celle ci reste, toutefois, non satisfaisante en raison des faibles quantités de protoplastes récupérés. Nous avons alors augmenté légèrement les densités à 17 et 19%.

La figure 24 montre que nous retrouvons, à 17% de saccharose, des quantités de protoplastes très rapprochées de celles de 15%. A la surface de la couche de saccharose nous avons obtenu 14,5% de protoplastes (petits et moyens), toujours mélangés aux débris fins, et le culot est formé de 11,6% de protoplastes mélangés à beaucoup de débris.

Le meilleur résultat est obtenu à 19% de saccharose où nous avons noté, selon la figure 24, une nette amélioration du degré de purification. Nous avons récupéré 24,33% de protoplastes à la surface de la couche sans pour autant les séparer totalement des débris fins et nous avons retrouvé 13,26% de gros protoplastes mélangés à une grande quantité de débris au niveau du culot.



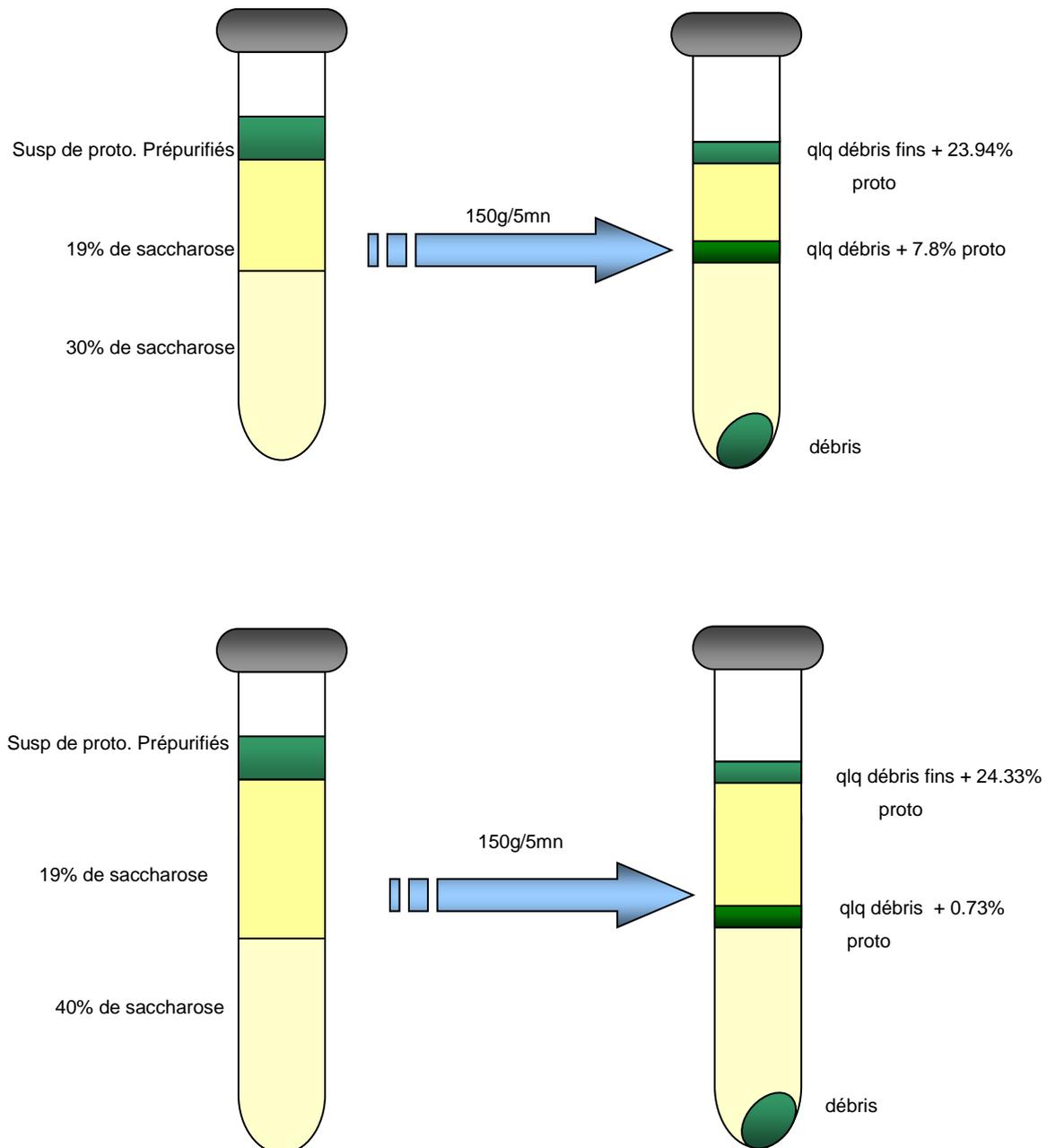
**Fig 24 : Effet des faibles densités de saccharose (monocouche) sur le degré de purification de protoplastes**

### **C/ Purification sur gradient discontinu (deux couches):**

Dans le but d'obtenir une séparation plus fine au niveau du culot, nous avons testé un gradient discontinu de saccharose à deux couches 19%/30% et 19%/40%. Nous avons obtenu 3 niveaux pour chaque essai :

- Un culot formé uniquement de gros débris.
- Une couche intermédiaire formée, respectivement, de 7,8% et 0,73% de protoplastes
- Une surface contenant, respectivement, 23,94% et 23,3% de protoplastes.

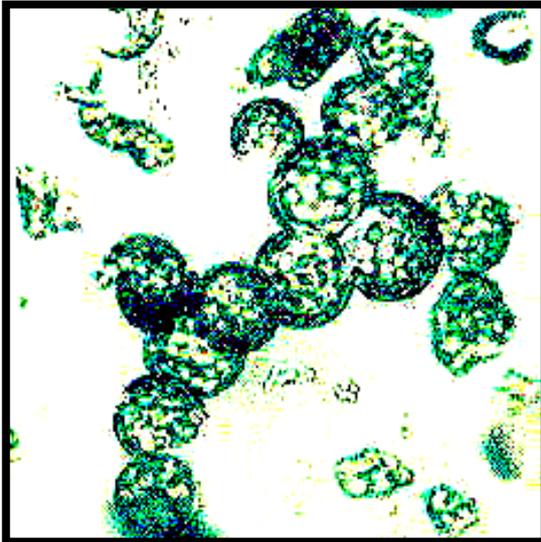
Nous avons constaté, alors, que le gradient 19/30% donne les meilleurs résultats (fig.25)



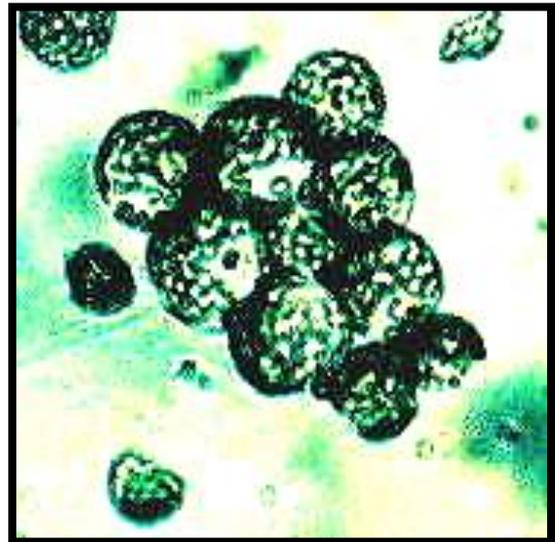
**Fig25 : Effet du gradient discontinu à deux couches de saccharose sur le degré de purification de protoplastes**

Compte tenu de tous ces résultats, nous pouvons dire que nous avons obtenu un degré maximum de purification dans nos conditions d'expérimentation avec le gradient discontinu à deux couches, 19%/30% où la première couche à faible densité permet de séparer les débris fins des protoplastes en ne laissant traverser que les protoplastes, et la deuxième couche à forte densité permet la séparation des débris des protoplastes du fait que ces derniers ne peuvent pas la traverser.

**A**



**B**



***Planche11 : Purification de protoplastes isolés ( $G=3.2 \times 100$ )***

***A: Purification à 19%/40% de saccharose***

***B: Purification à 19%/30% de saccharose***

## **DISCUSSION GENERALE**

### **1. Multiplication :**

Durant cette partie de notre expérimentation, nous avons noté que l'effet génération sur le développement des vitroplants est très significatif.

Selon Nozeran, (1978), Margara, (1986), au cours des générations qui se succèdent, les tiges deviennent de plus en plus grêles, et portent de plus en plus de feuilles simples, signe d'un retour à l'état juvénile. En effet, les germes de tubercules, qui représentent la G1, ont donné des vitroplants de grande vigueur qui se traduit par un nombre important de feuilles composées et des tiges de diamètre important. A la deuxième génération, une baisse de vigueur des vitroplants a eu lieu et s'est manifestée par un nombre réduit de feuilles simples et des tiges grêles. Ceci s'explique par la perte de certaines potentialités morphogénétiques du végétal issu de la multiplication végétative (Nozeran, 1978), traduisant ainsi le niveau de rajeunissement des vitroplants.

### **2. Callogénèse :**

Suite aux résultats obtenus durant cette étape, nous avons tiré les conclusions suivantes :

➤ L'effet traitement s'est révélé très hautement significatif en faveur du 2.4D, quelle que soit la nature de l'explant. Plusieurs auteurs ont montré que le 2.4D est l'auxine par excellence de la callogénèse à de faibles concentrations. Selon Okazawa (1966), la formation ainsi que le développement de cals sur pomme de terre sont intensifiés par l'utilisation de basse concentration de 2.4D, ce qui concorde avec nos résultats.

Nous avons remarqué que l'addition de la BAP n'a pas amélioré la réponse des explants à la callogénèse. Candona et Duncan (1997), ont remarqué aussi que la BAP n'est pas importante pour l'induction de cals, et l'effet de l'interaction BAP-2.4D est non significatif.

Cependant, le rapport 2.4D/BAP influence sensiblement le développement et la morphologie des cals. Nous avons constaté que, lorsque ce rapport est égal à 2 (T3), la croissance des cals est la plus importante et ils présentent un aspect hyperhydrique et friable, de couleur blanchâtre. En T2 et T5 où le rapport 2.4D/BAP = 1, nous avons obtenu une callogénèse moyenne à aspect vitrifié et friable, par contre les traitements T1 et T4 où la BAP est plus importante que le 2.4D, avec un rapport égal à 0.5, ont favorisé la formation de cals bruns compacts et à faible croissance. Les mêmes résultats ont été obtenus par Ashari et Villiers (1998) sur disc de pomme de terre variété "Désirée". Ils ont montré que la callogénèse est importante avec un rapport 2.4D/BAP de 1.5 à 2, moyenne avec un rapport = 1 et très faible avec un rapport = 0.5.

➤ De même, l'effet origine de l'explant s'est révélé très hautement significatif. L'influence de la nature de l'explant se marque aussi dans l'initiation, la croissance et la fréquence de l'obtention des cals (Quraichi *et al*, 1979).

En premier lieu, nous avons obtenu une différence entre les deux niveaux des fragments de tubercules en faveur de la zone périphérique. Ceci s'explique par le fait que la partie périphérique

contient les tissus cambiaux qui sont des méristèmes histogènes et leur état de dédifférenciation les rend souvent aptes à la callogénèse, par contre la zone médiane est formée de parenchyme médullaire de réserve. Selon Margara (1982), les cellules cambiales déjà méristématiques sont souvent les premières à manifester une intense activité mitotique lors de la mise en culture in vitro. Nos résultats s'accordent avec ceux obtenus par Lê *et al* (1997) sur explants de tubercules des variétés " Bintje et Charlotte". Ils ont noté qu'après 48 heures de culture les tissus prévasculaires entrent en division active et même la formation de bourgeons adventifs se situe principalement dans la zone périphérique. Cependant, le retard et le faible pourcentage enregistrés dans notre essai pour tous les traitements semblent être dus à la taille des explants qui était réduite. En effet, la taille de l'explant mis en culture présente une grande importance dans la réponse à la callogénèse. Nous avons remarqué que la majorité des explants se sont desséchés avant toute réaction, malgré le renouvellement régulier du milieu de culture

D'autre part, et concernant les deux autres origines d'explants, à savoir les tiges et les feuilles, nous avons enregistré une absence de prolifération de cals sur feuilles, la callogénèse s'est arrêtée au stade cicatriciel. Ceci peut être expliqué par le fait que les feuilles sont constituées par quelques couches de parenchyme palissadiques, selon Margara (1982), il est évident que la dédifférenciation ne peut affecter que les cellules qui ne sont pas trop engagées dans une spécialisation trop poussée, il semblerait alors que le parenchyme palissadique est très spécialisé. En parallèle, les entre nœuds ont manifesté une très forte activité mitotique qui s'est traduite par une croissance de cals très importante. Ceci confirme ce qui a été mentionné auparavant, puisque les entre nœuds (fragments de tiges) sont constitués essentiellement de parenchyme cortical et médullaire, et ces deux derniers de parenchymes sont considérés comme des tissus de remplissage très peu spécialisés, se traduisant par une très forte prolifération de cals.

### **3. Isolement de protoplastes :**

➤ Nous avons noté des chutes de rendements de protoplastes au-delà de la troisième heure de macération pour tous les traitements réalisés. Ceci peut être expliqué par :

- L'accumulation de chocs mécaniques dus à l'agitation prolongée (Khelifi, 1990)
- La présence d'impuretés apportées avec les enzymes. En effet, les produits utilisés contiennent encore trop d'impuretés (Demarly, 1982), notamment d'autres enzymes (telles que les ribonucléases, les protéases, les lipases), des phénols et des éléments résiduels des milieux de culture de l'organisme producteur (Kamoun, 2001) qui peuvent déstabiliser le plasmalemme (Khelifi, 1990). Par conséquent, un temps de contact trop long des tissus avec le mélange enzymatique conduit à une diminution du nombre de protoplastes viables ainsi qu'une réduction de leur temps de survie (Zryd, 1990).

➤ La suppression de la paroi et le maintien en vie des cellules nues ne peut se faire que si le milieu extérieur est hypertonique par rapport au milieu vacuolaire. Les faibles concentrations de

l'osmoticum entraînent une entrée d'eau dans les cellules et donc leur éclatement, se traduisant par l'apparition de débris cellulaires dans la solution enzymatique. Alors que les fortes concentrations entraînent la contraction des cellules et très peu de protoplastes sont formés. D'autre part, nous avons constaté que la concentration optimum de mannitol n'est pas la même pour les deux origines de tissus. Elle est plus importante pour les cals. Ceci peut être expliqué par le fait que les cals testés sont des cals vitrifiés, formés de cellules vacuolisées, gorgées d'eau, d'où une forte pression exercée sur leurs parois, ils nécessitent alors une plus forte concentration de mannitol, 0.8M/l (pour le maintien des cellules en vie) par rapport au mésophylle, 0.6M/l, qui est formé de cellules remplies de chloroplastes et peu vacuolisées.

➤ Nous avons noté aussi que le rendement en protoplastes de cals est deux fois plus important que celui du mésophylle, quel que soit le traitement utilisé. Ceci s'explique par le fait que les cals sont des tissus méristématiques non différenciés, leurs cellules sont facilement accessibles, une forte séparation des agrégats cellulaires a eu lieu, facilitant ainsi le contact des enzymes et se traduisant par une augmentation du nombre de protoplastes isolés, contrairement au mésophylle foliaire qui est formé de cellules d'autant plus protégées qu'elles sont différenciées (Demarly, 1982) et donc difficiles à dissocier. Cependant, malgré le rendement élevé en protoplastes de cals, celui-ci n'est pas stable dans le temps. A partir de la troisième heure de macération, une chute brutale du nombre de protoplastes a lieu jusqu'à leur disparition totale de la solution après 5 heures de macération. Il semblerait que cette perte de protoplastes est due, non seulement à l'impureté des enzymes, mais également au fait que les cellules de cals sont très hétérogènes. En effet, des cellules de différentes tailles et de différents âges sont issues de cals, certaines sont grandes et fortement vacuolisées, d'autres sont petites à cytoplasme plus dense. Il est alors difficile de trouver une combinaison adéquate de concentration de mannitol qui permet le maintien en vie des deux types de cellules. En plus, ces cellules semblent être très fragiles. En effet, lorsque nous avons testé les vitesses d'agitation, nous avons remarqué qu'à 50 rpm, où la vitesse est très faible, le nombre de protoplastes libérés est très important ( $9.9 \times 10^6$ ), une fois que nous avons augmenté cette vitesse à 100 rpm, le nombre chute de façon remarquable donnant ainsi des rendements insignifiants. Selon Ducreux et Laine (1984), l'agitation induit une meilleure libération de petits protoplastes, mais aussi augmente les débris et favorise l'éclatement des grands protoplastes.

➤ Suite à ces données, nous confirmons les résultats obtenus par Ellouz et al (1994) et Thomas (1981) qui ont montré que les protoplastes du mésophylle de plantes cultivées *in vitro* permettaient d'obtenir les résultats les plus reproductibles. Nous n'avons gardé que le mésophylle foliaire comme seule source de protoplastes pour le reste de l'essai.

Néanmoins, malgré l'optimisation des concentrations des éléments essentiels à la macération, les rendements en protoplastes de mésophylle restent faibles, avec un maximum de  $5.05 \times 10^6$ /g MF, nous avons alors tenté de les améliorer en agissant sur les conditions physiques de la macération, tel que la température, le pH, l'âge et la forme des feuilles.

A cette dernière étape de notre essai, nous avons noté une nette amélioration des rendements de protoplastes, qui est due essentiellement à trois facteurs : l'âge des feuilles, la température de macération et la préplasmolyse.

➤ L'âge des feuilles est un facteur limitant dans l'isolement des protoplastes puisqu'il détermine l'âge des cellules à isoler. Le principe de la technique de protoplastes est l'élimination des parois cellulaires, leur constitution et le niveau de leur différenciation sont, de ce fait, le premier facteur à prendre en considération. La paroi squelettique de la cellule est typiquement pectocellulosique chez les cellules jeunes (Deysson, 1978) dont la cellulose est à l'état de grosse molécules groupées en faisceaux noyés dans un ciment pectique (Obré et Chaton, 1971). Au fur et à mesure que la cellule vieillit, des couches secondaires successives de cellulose s'y ajoutent (Pillet, 1968 ; Obré et Chaton, 1971) et l'ensemble constitue la paroi secondaire. Son apparition s'accompagne de la perte de toute possibilité d'accroissement (Deysson, 1978). Il semblerait alors que la digestion enzymatique est plus intense lorsque la paroi est primaire formée de quelques couches de cellulose. La libération des protoplastes est, de ce fait, plus importante chez les tissus jeunes, donnant ainsi des rendements plus élevés que ceux des tissus âgés. Masson et al (1997) préconisent l'utilisation de feuilles âgées de 2 semaines.

➤ La température de macération est un autre paramètre déterminant du fait qu'il conditionne l'activité enzymatique. Cette dernière est plus importante à hautes températures (30°C). Gosch et al, (1975) estiment que l'effet de la température sur la libération de protoplastes est très significatif. Ils ont montré que le temps d'isolement de protoplastes à 28°C est de 6 heures, alors qu'à une température de 38°C, 3 heures sont suffisantes pour l'obtention d'un maximum de protoplastes.

➤ En dernier lieu, nous avons noté que la préplasmolyse a augmenté considérablement les rendements en protoplastes. Cette augmentation consiste, non seulement à une meilleure libération qui se prolonge dans le temps, mais également au maintien en bon état des cellules libérées.

Le plasmalemmes, rappelons-le, est étroitement appliqué à la paroi cellulaire, à l'exception des zones de rupture constituées par les plasmodesmes. Lors de la macération, la digestion des parois pectocellulosiques se fait de manière brusque et risque d'abîmer le plasmalemmes ou de le déstabiliser conduisant ainsi à la détérioration de la cellule. La préplasmolyse facilite le décollement total du plasmalemmes de la paroi par abaissement de la turgescence du milieu intracellulaire, le protoplaste se forme alors à l'intérieure de la cellule avant même la suppression de la paroi. Lorsque les enzymes agissent, le contenu cellulaire ainsi que le plasmalemmes sont protégés contre le choc dû à l'hydrolyse de la paroi pectocellulosique et on obtient, par conséquent, une meilleure libération de protoplastes et un meilleur rendement.

## Conclusion Générale

Le présent travail vise à maîtriser la production de protoplastes dans le but de l'amélioration de la pomme de terre via la fusion de protoplastes.

Nous pensons avoir pu apporter, au terme de cette étude, des résultats qui présentent des éléments de réponse aux questions posées à ce sujet, et qui peuvent être utilisées directement dans un programme d'hybridation somatique.

Pour cela, nous nous sommes d'abord intéressée à la multiplication du matériel végétal source de protoplastes à savoir le mésophylle foliaire et les cals.

Concernant le mésophylle foliaire, et dans le but d'avoir le maximum de matière fraîche pour l'isolement de protoplastes, nous avons montré l'effet génération sur le diamètre des tiges, la quantité et la dimension des feuilles. La G1 répond largement à nos besoins en produisant des plantules à grandes feuilles à raison de 10/vitroplants après 5 semaines de culture, contrairement à la G2 qui a subi un rajeunissement et qui n'a donné que des plants chétifs portant quelques petites feuilles. Les microtubercules, quant à eux, ont eu un développement médiocre.

L'autre aspect auquel nous avons accordé une attention particulière est la callogénèse. En effet, la qualité et la quantité des cals obtenus en un minimum de temps conditionnent l'isolement de protoplastes. Nous avons étudié, pour cela, l'influence de 2 facteurs à savoir la balance hormonale du milieu de culture et l'origine d'explants.

L'examen statistique a mis en évidence des différences très hautement significatives entre les différentes origines d'explants en faveur des entre-nœuds. Ces derniers ont manifesté une callogénèse très remarquable du point de vu "temps d'initiation de cals, taux de reprise et l'ampleur de leur croissance". Quant aux fragments de tubercules et plus précisément ceux de la zone médiane ils doivent normalement présenter une callogénèse importante, mais ça n'a pas été le cas dans notre essai en raison de la taille des explants qui s'avère être un facteur déterminant dans la formation de cals. Nous pensons alors qu'il est nécessaire de tenir compte des dimensions des fragments de tubercules dans l'étude de la callogénèse sur ce type d'explants.

En ce qui concerne les balances hormonales, selon nos résultats, nous avons d'abord confirmé le fait que le 2,4D soit l'auxine par excellence de la callogénèse, et que la BAP n'est nécessaire ni à l'initiation ni à la croissance des cals, bien au contraire plus le rapport BAP/2.4D est grand plus la callogénèse est réduite. Ensuite, nous avons pu mettre en évidence l'inexistence de toute interaction entre la balance hormonale et l'origine d'explants. Les entre nœuds, les fragments de tubercules et les feuilles ont tous eu la même réaction à chaque balance.

En dernier lieu, nous avons tenté d'optimiser les conditions d'isolement de protoplastes. Nous avons d'abord déterminé les combinaisons optimales d'enzymes de macération qui donnent les meilleurs rendements en fonction des tissus source de protoplastes.

Il ressort de nos résultats que l'utilisation de l'osmoticum dépend de l'état de turgescence des cellules, et que la digestion des parois n'est pas la même pour le mésophylle et les cals. Cette différence est due à la nature des parois des deux tissus et de leur constitution. Nous pensons donc qu'il est impératif d'utiliser des enzymes à activité spécifique à chaque tissu au lieu de faire varier leurs concentrations.

D'autre part, les conditions physiques s'avèrent être des facteurs déterminant de l'obtention de protoplastes puisque le degré de macération est augmenté à chaque fois que nous y apportons des changements à savoir: la vitesse d'agitation, l'âge des feuilles et la température de macération.

La plus grande attention doit être portée à la préplasmolyse. C'est une étape supplémentaire qui a, cependant, amélioré les rendements de protoplastes du simple au double, puisqu'elle a permis de maintenir les cellules intactes et éviter leur détérioration lors de l'action des enzymes.

En conclusion, ces essais que nous estimons préliminaires méritent d'être approfondis et élargis par des tests de viabilité des protoplastes, condition *sine qua non* de la régénération de plants à partir de protoplastes dans tout programme d'hybridation somatique ou autres études.

Nous pouvons ajouter aussi que l'effet génotype est très marqué et qu'il n'existe pas de règles générales appliquées à toutes les espèces (ou même les cultivars) pour l'obtention des meilleurs résultats. Chaque génotype présente ses propres exigences de milieu, de types d'enzymes et de conditions physiques, et il est impératif de les déterminer à chaque étude.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANONYME, 1979.** La pomme de terre : maladies et nématodes. CIP. Lima, Pérou. pp67
- ANONYME, 1994.** La défense des cultures en Afrique du Nord. Deutsch gescllschaft für technische Zusammenarbeit. Pp102.
- AUGE. R, BACCON-GIBOT.J, 1990.** Les applications à l'horticulture. In La culture in vitro et ses applications Horticoles. Ed. Tec & Doc. Lavoisier, J.B Bailliere. Paris, pp63-89
- BEAUCHESNE. G, 1990.** L'historique et les fondements de la culture *in vitro*. In. La culture in vitro et ses applications horticoles. Ouvrage collectif. Ed. Tec &Doc. Lavoisier, J.B Baillere, Paris. pp1-29
- BEDIN. P, 1996.** Le rhizoctone brun de la pomme de terre. . In. La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. Ed. INRA, pp291-296
- CALLEBERG. E.K et MERKER. A, 1997.** Selection for low temperature tolerance in potato through anther culture. P.M.A. Tigerstedt (Ed.), *Adaptation in plant breeding*, pp45-48.
- CARDONA. C.A, DUNCAN. R.R, 1997.** Cell biology and molecular genetics: Callus induction and high efficiency plant regeneration via somatic embryogenesis in Paspalum. *Crop Science*. 37. pp1297-1302.
- CHAGRARDIEFF. P , 1985.** L'utilisation de la variabilité exprimée spontanément en culture en vue de l'amélioration des plantes. *Actual. Bot.* (3/4), pp97-103.
- CHASE. S.S, 1963.** Analytic breeding in *Solanum tuberosum*. L. A scheme utilizing parthenots and other diploid stocks. *Can. J. Genet. Cytol.* 5. pp359-363.
- CHUPEAU. Y, et BOURGIN. J.P, 1980.** Les protoplastes des cellules végétales. In. La multiplication végétative des plantes supérieures. Chaussat et Bigot. Ed. Gauthier-Villars Paris, pp 191-219
- COCKING. E.C, 1960.** A methode for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*. 187, pp962-963.
- COCKING. E.C, 1972.** Plant cell protoplast: isolation and development. *Ann. Rev. Plant physiol.* 23, pp29-50.
- DARPOUX. R, DEBELLEY. M, 1967.** Les plantes sarclées. Ed. Bailliere, PARIS. 307p.
- DEMARLY. Y, 1982.** Intérêts des protoplastes. In. Colloque, les cultures végétales *in vitro* : réalité agricole et industrielle. Association pour la promotion industrie-agriculture, Paris. pp67-72.
- DEMARLY. Y, 1990.** Réflexion sur les rapports entre CIV et amélioration des plantes. In. Cinquantenaire des CIV chez les végétaux. Ed. Les Colloques de l'INRA. 347 p.
- DEMARLY. Y et SIBI. M, 1996.** Amélioration et biotechnologie des plantes. Ed. John Libbey Enrotext, Paris.
- DODDS. J.H, 1995.** Experiments in plant tissue culture. Ed. Combridge University Press.
- DUCREUX. G, ROSSIGNOL. L et ROSSIGNOL. M, 1986.** La pomme de terre. *La recherche*. 174, pp193-203

- DUVAUCHELLE. S et ANDRIVON. D, 1996.** Le mildiou et son agent *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. In. La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. Ed. INRA, pp283-291
- ELLISSECHE. D, 1996.** Aspect physiologique de la croissance et du développement de la pomme de terre. In. La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. Ed. INRA, pp
- ELLOUZ.O, LAKHOUA. L, GARGOURI. A, 1994.** Polymorphisme de l'ADN total chez les plantes régénérées à partir de protoplastes de pomme de terre. *Quel avenir pour l'amélioration des plantes?*. Ed. AUPELF. Paris, pp241-249.
- ESNA-ASHARI. M et VILLIERS. T.A, 1998.** Plant regeneration from tuber discs of potato *Solanum tuberosum* L using 6-benzylaminopurine (BAP). *Potato research*. 41, pp371-382
- GAUCHER. D., PASCO.C., BOUCHEK.K., DEPAYS.C. et GUERIN. C., 1997.** Pomme de terre : des maladies à connaître. *Perspectives agricoles*. 222, pp32-38.
- GAULT. A, 1938.** La pomme de terre : culture, sélection, utilisation. Ed. Flammarion, p157
- GAUTHERET. M.R, CHUPEAU. Y, MOREL.G, 1970.** Histophysiologie végétale : obtention de protoplastes de plantes supérieures à partir de tissus cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, P270.
- GOSCH.G, BAJAJ. Y.P.S, REINERT. J, 1975.** Isolation, culture and fusion studies on protoplast from different species. *Protoplasma*. 85/ 2-4. pp327-335.
- HANSEN. J. NIELSEN. B, and NIELSEN. S.V.S, 1999.** In vitro shoot regeneration of *Solanum tuberosum* cultivars: interactions of medium composition and leaf, leaflet and explants position. *Potato research*. 42, pp141-151.
- HAWKES. J. G, 1994.** Origins of Cultured Potato and Species relationships. In Potato genetic. Bradshaw.Ed. CAB International. Willingford (GB). Pp
- JACOBSEN.E, et ROUSSELLE. P, 1993.** La pomme de terre. In. Méthodes traditionnelles de sélection de plantes. Ed ; OCDE. Paris, pp207-221.
- KAMMOUN. R.M, 2001.** Effet de la pectolyase R-23 et de la cellulase RS sur le rendement en protoplastes viables du cerisier cv. Montmorency. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 5(2), pp99-104.
- KARP.A, JONES. M.G.K, OOMS.G, BRIGHT. S.W, 1988.** Potato protoplast and tissue culture in crop improvement. In Biotechnology of higher plant. Anonyme. Ed. Dorset (GB) pp1-25
- KERLIN. C, 1996.** Maladies à virus. In. La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. Ed. INRA, pp232-260
- KHELIFI.L , 1990.** Protoplastes d'organes et de cals de vitrosemis de mélèze d'Europe (*Larix decidua* Mill). Préparation et culture. Eléments de physiologie et de cytologie respiratoire. Thèse Doc. De l'université de Nancy I. 206p
- KIKUTA.Y, FUJINO.K , SAITO.W, MASUD.K , OKAZAWA.Y, 1986.** Protoplast culture of potato: an improved procedure for isolating viable protoplasts. *J. of the fac. of agri. Hokkaido university*. Vol. 62.pt.4

- KUMAR. A, 1994.** Sonaclonal variation. In. Potato genetic. . Bradshaw. Ed. CAB International. Willingford (GB).
- LAINÉ. E, et DUCREUX.G, 1987.** Plant regeneration from root apical protoplasts of *Solanum tuberosum* cv. BF15. *J. plant physiol.* Vol. 126. pp345-354.
- LÉ. C.B, NOWBUTHE. L, HEDIGER. S et COLLET. G.F, 1997.** Régénération *in vitro* de la pomme de terre cultivée *Solanum tuberosum*. L. *Revue Suisse Agric.* 29(3) : pp143-150.
- LETOUZE. R , et BEAUCHESNE. G, 1990.** La technologie de la CIV : principe et application agricoles. In Compte rendu du Séminaire Maghrébin sur la multiplication rapide du palmier dattier en culture IV. Ed. FAO.p
- Lİ. G.G, CONSTABEL.F, 1984.** Plant regeneration with callus and protoplast of *Solanum upron* Dun. *J. Plant. Physiol.* vol. 117. pp137-142.
- MARGARA, J. 1982.** Base de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse. Ed. INRA, Paris. 262p.
- MASSON.J, LECERF.M, ROUSSELLE.P, PERNNEC.P, PELLETIER.G , 1987.** Plants regeneration from protoplasts of diploid potato derived from crosses of *Solanum tuberosum* with wild *Solanum* species. *Plant science.* (53). pp167-176
- MESSIAEN. C.M, 1981.** Les variétés résistantes : méthodes de lutte contre les maladies et ennemis des plantes. Ed. INRA. Paris, 374p.
- MURASHIGE. T., et SKOOG. F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, pp473-497.
- NOZERAN. R, 1978.** Polymorphisme des individus issus de multiplication végétative des végétaux supérieurs avec conservation du potentiel génétique. *Physiol. Végét.* vol.16. n°2.
- OBRE. A et CHANTON. R, 1971.** Biologie cellulaire. Organisation de la cellule. 4° Ed. Doin. 411p
- OKASAWA. Y, KATRSURA. N, TAGAWA.T, 1966.** Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum.* Vol.20. pp862-869.
- ORTIZ. R et PELLOQUIN.S.J, 1994.** Use of 24. Chromosome Potatoes (Diploids and dihaploids) for genetical analysis. In Potato genetic. Bradshaw. Ed. CAB International. Willingford (GB). Pp
- PEHU, E. 1996.** The current Status of Knowledge on the cellular biology of potato. *Potato research* . 39 ; pp429-435.
- PELLETIER. G, 1988.** Protoplastes ; méthodologie, fusion et hybridation somatique. In. Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondement théorique et utilisation pratique. Zryd. J.P. Ed. Presse Polytech. Romand.
- PILLET. P.E, 1968.** La cellule : Structure et fonction. 3°Ed. Masson et Cie. 399p.
- RAZDAN.M.K, 1993.** An introduction to plant tissue culture. Ed. Hampshire (GR). 398p
- ROSSELLE. P, ROUSSELLE-BOURGEOIS. F, et ELLISSECHE. D, 1990.** La pomme de terre. In. Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Andre Gallais. Ed. Masson. 588p.
- ROUSSELLE-BOURGEOIS. F et ROUSSELLE. P, 1992.** Création et Sélection de populations diploïdes de pomme de terre (*Solanum tuberosum*. L). *Agronomie.* 12. p59-67.

- ROUSSELLE. P, ROUSSELLE-BOURGEOIS. F et ELLISSECHE.D, 1992.** La pomme de terre. In. Amélioration des espèces végétales cultivées. Gallais. A et Bannerot. H. Ed. INRA. Paris, pp243-263
- ROUSSELLE-BOURGEOIS.F et ROUSSELLE. P, 1995.** Agronomic and technological evaluation and selection of tetraploide clones of potato (*Solanum tuberosum*. L) originating from diploids populations. *Agronomie*. 15; pp285-293
- ROUSSELLE. P, CHAUVIN. L et ROUSSELLE-BOURGEOIS.F, 1995.** La sélection pour la résistance aux virus Y (PVY) chez la pomme de terre de l'INRA. *Ann. du Tabac*. Sect. 2/27. pp 1-5.
- ROUSSELLE-BOURGEOIS.F et ROUSSELLE. P, 1996.** Amélioration génétique de la pomme de terre. In. La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. Ed. INRA, pp125-154.
- SEILLEUR. P, 1989.** Amélioration génétique de la résistance aux agents pathogènes. In *Traité de pathologie végétale*. Jean Semal ; Les Presses Agronomique de Gembloux. Belgique ; 621 p.
- SHEPARD. J.F., 1982.** Cultivars dependant cultural refinement in potato protoplasts regeneration. *Plant. Sci. Lett.* 26, pp127-132.
- SOLTNER. D, 1990.** Les grandes productions végétales : céréales, plantes sarclées, prairies. ANGERS. Science et Techniques Agricoles.
- TAKEBE. I, LABIB. G et MELCHERS. G, 1971** Regeneration of whole plants from isolated mésophylle protoplasts of tobacco. *Naturwiss.* 58. pp318-320..
- TEOULE. E, 1999.** Biotechnologie et amélioration de plantes. In *Biotechnologie*. René Scriban. Ed. Tec & Doc. pp598-612
- THOMAS. E, 1981.** Plant regeneration from shoot culture derived protoplast of tetraploid potato *Solanum tuberosum* cv. Maris Bard. *Plant Sci. Lett.* 23. pp81-88.
- TIVOLI. B, 1996.** Les pourritures sèches des tubercules en conservation : les fusarioses et les gangrènes. In. La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. Ed. INRA, pp299-304
- TIVOLI. B et BEDIN. P, 1996.** Maladies fongiques. In. La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. Ed. INRA, pp280-282
- VILAIN. M, 1987.** La production végétale. Ed. Tec and Doc. Lavoisier, T2. 416p.
- WENZEL. G, 1994.** Tissue Culture. In. *Potato genetics*. Bradshaw. Ed CAB International. Willingford (GB). Pp
- ZRYD. J.P, 1988.** Culture de cellules, tissus et organes végétaux: fondement théorique et utilisation pratique. Ed. Press. Polytech. Romand. p308.

ANALYSE DE VARIANCE temps de callogenese

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	50719.65	59	859.66				
VAR.FACTEUR 1	415.07	4	103.77	16.26	0.0000		
VAR.FACTEUR 2	568.85	3	189.62	29.71	0.0000		
VAR.INTER F1*2	49480.40	12	4123.37	645.96	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 1	255.33	40	6.38			2.53	6.9%

FACTEUR 1 : TRAITEMENT

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

3 TR3	41.08	A
2 TR2	37.83	B
4 TR4	36.17	B C
5 TR5	34.33	C
1 TR1	33.83	C

FACTEUR 2 : ORIGINE

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

4 O4	41.87	A
1 O1	35.87	B
3 O3	34.80	B
2 O2	34.07	B

ANALYSE DE VARIANCE vitesse d'agitation

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	130.24	47	2.77				
VAR.FACTEUR 1	31.35	3	10.45	420.55	0.0000		
VAR.FACTEUR 2	77.90	3	25.97	1045.17	0.0000		
VAR.INTER F1*2	20.20	9	2.24	90.32	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 1	0.80	32	0.02			0.16	7.5%

FACTEUR 1 : vitesse

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

3 D3	3.13	A
4 D4	2.50	B
2 D2	1.84	C
1 D1	0.95	D

FACTEUR 2 : TEMPS

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

2	T2	3.52	A
1	T1	3.23	B
3	T3	0.87	C
4	T4	0.80	C

ANALYSE DE VARIANCE température de macération

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	92.01	44	2.09				
VAR.FACTEUR 1	2.13	2	1.06	6.65	0.0042		
VAR.FACTEUR 2	78.53	4	19.63	122.54	0.0000		
VAR.INTER F1*2	6.54	8	0.82	5.11	0.0005		
VAR.RESIDUELLE 1	4.81	30	0.16			0.40	12.5%

FACTEUR 1 : TEMPERATURE

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

3	TM3	3.49	A
2	TM2	3.12	B
1	TM1	2.97	B

FACTEUR 2 : TEMPS

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

5	T5	5.74	A
3	T3	2.96	B
4	T4	2.93	B
2	T2	2.27	C
1	T1	2.07	C

ANALYSE DE VARIANCE préplasmolyse

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	815.08	29	28.11				
VAR.FACTEUR 1	2.79	1	2.79	531.97	0.0000		
VAR.FACTEUR 2	441.20	4	110.30	21025.88	0.0000		
VAR.INTER F1*2	370.98	4	92.75	17679.40	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 1	0.10	20	0.01			0.07	0.9%

FACTEUR 1 : PREPLASMOLYSE

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

1 PP1	8.43	A
2 TEM	7.82	B

FACTEUR 2 : TEMPS

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

2 T2	15.35	A
3 T3	8.36	B
1 T1	6.80	C
5 T5	5.66	D
4 T4	4.45	E

ANALYSE DE VARIANCE forme des feuilles

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	72.08	29	2.49				
VAR.FACTEUR 1	0.45	1	0.45	31.47	0.0000		
VAR.FACTEUR 2	61.26	4	15.32	1062.15	0.0000		
VAR.INTER F1*2	10.08	4	2.52	174.67	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 1	0.29	20	0.01			0.12	5.4%

FACTEUR 1 : FORME FEUILLE

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

2 FF2	2.35	A
1 FF1	2.10	B

FACTEUR 2 : TEMPS

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

5	T5	4.04	A
4	T4	3.85	B
3	T3	1.48	C
2	T2	1.06	D
1	T1	0.69	E

ANALYSE DE VARIANCE age des feuilles

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES	MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	53.95	44	1.23					
VAR.FACTEUR 1	0.31	2	0.15		8.74	0.0011		
VAR.FACTEUR 2	24.34	4	6.08		344.51	0.0000		
VAR.INTER F1*2	28.77	8	3.60		203.66	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 1	0.53	30	0.02				0.13	3.4%

FACTEUR 1 : AGE FEUILLE

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

1	FA1	4.02	A
2	FA2	3.99	A
3	FA3	3.83	B

FACTEUR 2 : TEMPS

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

3	T3	5.08	A
1	T1	4.41	B
2	T2	3.83	C
5	T5	3.41	D
4	T4	3.00	E

ANALYSE DE VARIANCE concentration de la pectinase

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	5.01	47	0.11				
VAR.FACTEUR 1	3.53	3	1.18	195.17	0.0000		
VAR.FACTEUR 2	0.22	3	0.07	12.10	0.0000		
VAR.INTER F1*2	1.07	9	0.12	19.64	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 1	0.19	32	0.01			0.08	3.0%

FACTEUR 1 : DOSE

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

2	P2	3.06	A
4	P4	2.47	B
1	P1	2.42	B
3	P3	2.41	B

FACTEUR 2 : TEMPS

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

2	T2	2.67	A
3	T3	2.61	A
4	T4	2.60	A
1	T1	2.49	B

ANALYSE DE VARIANCE concentration du mannitol

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	118.55	74	1.60				
VAR.FACTEUR 1	42.26	4	10.57	91.45	0.0000		
VAR.FACTEUR 2	40.87	4	10.22	88.44	0.0000		
VAR.INTER F1*2	29.65	16	1.85	16.04	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 1	5.78	50	0.12			0.34	27.9%

FACTEUR 1 : DOSE

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

3	M3	2.53	A
4	M4	1.38	B
5	M5	1.05	C
2	M2	0.90	C
1	M1	0.24	D

FACTEUR 2 : TEMPS

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

3	T3	2.24	A
1	T1	1.63	B
2	T2	1.44	B
4	T4	0.64	C
5	T5	0.16	D

ANALYSE DE VARIANCE concentration de cellulase

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	204.79	74	2.77				
VAR.FACTEUR 1	98.46	4	24.61	115.13	0.0000		
VAR.FACTEUR 2	83.96	4	20.99	98.18	0.0000		
VAR.INTER F1*2	11.68	16	0.73	3.41	0.0005		
VAR.RESIDUELLE 1	10.69	50	0.21			0.46	17.6%

FACTEUR 1 : DOSE

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

3	C3	3.94	A
4	C4	3.83	A
5	C5	2.60	B
2	C2	1.75	C
1	C1	1.01	D

FACTEUR 2 : TEMPS

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

1	T1	3.75	A
3	T3	3.71	A
2	T2	2.79	B
4	T4	1.81	C
5	T5	1.06	D

ANALYSE DE VARIANCE source de protoplastes

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.
C.V.						
VAR.TOTALE	270.63	29	9.33			
VAR.FACTEUR 1	2.09	1	2.09	169.30	0.0000	
VAR.FACTEUR 2	182.76	4	45.69	3699.36	0.0000	
VAR.INTER F1*2	85.54	4	21.39	1731.52	0.0000	
VAR.RESIDUELLE 1	0.25	20	0.01			0.11 2.2%

FACTEUR 1 : CALMESO

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

1 C1	5.40	A
2 C2	4.88	B

FACTEUR 2 : TEMPS

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

2 T2	9.75	A
5 T5	4.95	B
3 T3	4.89	B
4 T4	3.51	C
1 T1	2.60	D

ANALYSE DE VARIANCE taux de cals

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	49402.24	59	837.33				
VAR.FACTEUR 1	1750.56	4	437.64	172.82	0.0000		
VAR.FACTEUR 2	47051.41	3	15683.80	6193.44	0.0000		
VAR.INTER F1*2	498.98	12	41.58	16.42	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 1	101.29	40	2.53			1.59	2.4%

test de NEWMAN-KEULS - seuil = 5%

=====

FACTEUR 1 : Traitement

-----

NOMBRE DE MOYENNES	2	3	4	5
VALEURS DES PPAS	1.31	1.58	1.74	1.86

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

3	T3	75.18	A
2	T2	69.20	B
5	T5	68.72	B
4	T4	63.52	C
1	T1	59.30	D

FACTEUR 2 : Origine

-----

NOMBRE DE MOYENNES	2	3	4
VALEURS DES PPAS	1.17	1.41	1.56

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

1	Tig	94.12	A
2	Feu	90.83	B
3	Ptu	58.84	C
4	Mtu	24.96	D

ANALYSE DE VARIANCE croissance de cals

=====

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	51641.21	29	1780.73				
VAR.FACTEUR 1	11423.59	4	2855.90	204.38	0.0000		
VAR.FACTEUR 2	32716.22	1	32716.22	2341.35	0.0000		
VAR.INTER F1*2	7221.94	4	1805.48	129.21	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 1	279.46	20	13.97			3.74	5.5%

test de NEWMAN-KEULS - seuil = 5%

=====

FACTEUR 1 : Traitement

-----

NOMBRE DE MOYENNES	2	3	4	5
VALEURS DES PPAS	4.50	5.46	6.04	6.46

F1 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

3	T3	103.30	A
2	T2	70.65	B
5	T5	66.47	B
4	T4	50.50	C
1	T1	49.50	C

FACTEUR 2 : Origine

-----

NOMBRE DE MOYENNES	2
VALEURS DES PPAS	2.85

F2 LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

1	Tig	101.11	A
2	Ptu	35.06	B

## Résumé

Le présent travail a porté sur l'optimisation des facteurs qui influencent l'isolement de protoplastes issus de cals et de mésophyte foliaires de vitro plants de la pomme de terre.

Malgré que la réaction de tous les type d'explants en présence de différentes balances hormonales ait été observée, l'intensité de la callogénèse varie en fonction du milieu et du type d'explants. Les meilleurs cals ont été obtenus avec les entre nœuds sur T3 (2.4D/BAP=2)

Les mésophiles foliaires et les cals d'entre nœuds de vitro plants de la G1 présentent des exigences différentes en condition d'isolement de protoplastes. En effet, les concentrations optimales en agent osmotique et en enzyme de macération ne sont pas les même pour les deux source de protoplastes. De plus, le mésophile foliaire s'avère être la meilleure source puisqu'il donne des protoplaste plus stables

La dernière étape de l'isolement de protoplastes est la purification de la suspension issue de mésophyle foliaire. Nous avons pu montrer que le gradient discontinu à deux couches de saccharose 19/30% donne une meilleure séparation de débris des protoplastes et donc un meilleur niveau de purification.

### Mots clé :

Pomme de terre, solanum tuberosum, micropropagation, callogénèse, isolement, purification protoplastes

### Summary :

The present work deals with optimization of factors influenced the protoplasts isolation made from callus and leaf mesophyll

All types of explants have reacted to different hormonal scales, however, callogenesis was more important with steam fragment on T3 (2.4D/BAP=2)

Leaf mesophyll and callus of G1 vitroplants present different requirements of protoplasts isolation condition. Indeed, optimal concentrations of mannitol, cellulose and pectinase are not the same for two protoplasts sources; in addition mesophyll is proving to be the best source since it gives stable protoplasts.

The last step of protoplasts isolation is there purification. We have demonstrated discontinues gradient with two saccharose levels 19/30% give best purification.

### Key words:

Potatoes, solanum tuberosum, micropropagation, callogenesis, isolation, purification, protoplasts

## ملخص:

يهدف هذا العمل إلى تحسين العوامل المؤثرة في عملية عزل البروتوبلاست المنحدرة من الكالوس و أوراق نبات البطاطس. مع أن تفاعل كل أنواع Explants بوجود هرمونات بمختلف التراكيز قد تم ملاحظته، فإن التكلس كان بدرجات مختلفة. لاحظنا أن أحسن كالوس تم الحصول عليه مع قطع ساق النبات في وسط (2.4D/BAP=2)T3

لقد أظهر الميزوفيل الورقي و الكالوس المتحصل عليه من قطع ساق نبات احتياجات مختلفة من تركيز المانيتول، السيليلاز و البكتيناز. و تبين أن الميزوفيل الورقي يعطي أحسن النتائج بإعطائه بروتوبلاستات جيدة. آخر مرحلة لهذا العمل كانت تصفية البروتوبلاست. لقد بينا أن المركب المتكون من طبقتان مختلفتا التركيز من السكرين يعطي أحسن مستوى لتصفية البروتوبلاست من الشوائب.

### كلمات مفتاح:

بطاطس Solanum tuberosum، تكاثر، تكلس، عزل، تصفية، بروتوبلاست.